



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Σίμος

Διδακτορική Διατριβή

**«Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ
ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ ΣΤΗΝ
ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ»**

υπό

ΑΓΓΕΛΙΚΗΣ ΚΑΡΑΓΙΩΤΑ

Βιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2018

Η παρούσα διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με την υποστήριξη του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) με υποτροφία προς την κ. Αγγελική Καραγιώτα στα πλαίσια της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» - MIS 5000432 που πραγματοποιήθηκε με πόρους του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) και του Ελληνικού Δημοσίου.

Μέρος της διατριβής υποστηρίχθηκε από τη δράση «ΑΡΙΣΤΕΙΑ II» και στα πλαίσια του έργου «Κωδ. 3129, Ακρωνύμιο HYPOXYTARGET, Στόχευση των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF στη φλεγμονή και τον καρκίνο (Targeting the hypoxia-inducible transcription factors HIFs in inflammation and cancer)» που συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) και Εθνικούς Πόρους

© 2018 Αγγελική Καραγιώτα

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (7^η/20-12-2018 ΓΣΕΣ):

1^{ος} Εξεταστής Ηλίας Μυλωνής

(Επιβλέπων) Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής Γεώργιος Σίμος

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής Γεωργία Χαχάμη

Λέκτορας Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής Ελένη Γεωργιάτσου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας - Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής Παναγιώτης Λιάκος

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής Ανδρέας Τσακάλωφ

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής Ευφροσύνη Παρασκευά

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Η. Μυλωνή. Αισθάνομαι τυχερή που είχα την ευκαιρία να ενταχθώ στο εργαστήριο αυτό, να γνωρίσω και να συνεργαστώ με τα αξιόλογα μέλη του. Για το λόγο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην διεκπεραίωση της διδακτορικής μου διατριβής και ιδιαιτέρως τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, στα οποία οφείλω την εργαστηριακή μου εκπαίδευση, την αγάπη μου για την επιστήμη και την καλλιέργεια της επιστημονικής σκέψης, και τα οποία αποτελούν πρότυπα για μένα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από τον καρδιά μου τον επιβλέποντα μου κ. Η. Μυλωνή, για την ανάθεση της διατριβής, την καθοδήγησή του ήδη από το στάδιο του μεταπτυχιακού και όλες τις γνώσεις που μου μετέδωσε, για την πολύτιμη βοήθεια, τη στήριξή του σε κάθε δύσκολο βήμα μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αλλά και την υπομονή, την επιμονή και την πραότητα του. Οι απέραντες γνώσεις του και το ήθος του ήταν παράδειγμα για μένα στο δρόμο για την κατάκτηση του διδακτορικού μου.

Επιπλέον ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω προς την κ. Γ. Χαχάμη, Λέκτορα Κυτταρικής Βιοχημείας, υπό την καθοδήγηση της οποίας πραγματοποιήθηκε ένα σημαντικό μέρος της διατριβής μου. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την υπέροχη συνεργασία μας, την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε, τις πολύτιμες συμβουλές, τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας, την εμπιστοσύνη, την υπομονή της αλλά και τον ευχάριστο χαρακτήρα της.

Πέρα από την εξαιρετική συνεργασία μας στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής, ο κ. Μυλωνής και η κ. Χαχάμη στάθηκαν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια ως πραγματικοί φίλοι και μου έδειξαν απεριόριστη φροντίδα, έτσι ώστε κατέχουν ξεχωριστή θέση στην καρδιά μου.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας, Καθηγητή Βιοχημείας και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Γ. Σίμο, τον οποίο εκτιμώ και θαυμάζω απεριόριστα. Τον ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε εντάσσοντας με στο εργαστήριο του, για τις καίριες συμβουλές, την παρακολούθηση και το συντονισμό όλης της προόδου της διατριβής μου, το τελικό αποτέλεσμα της οποίας δεν θα ήταν το ίδιο χωρίς τη δική του συμβολή.

Νιώθω πολύ τυχερή που αυτοί οι λαμπροί επιστήμονες και αξιόλογοι άνθρωποι αποτέλεσαν τους μέντορές μου.

Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, κ. Ε. Γεωργιάτσου, κ. Π. Λιάκο, κ. Α. Τσακάλωφ και κ. Ε. Παρασκευά, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους και το χρόνο που διέθεσαν για την αξιολόγηση της προόδου μου και της διατριβής μου.

Ένα πολύ θερμό ευχαριστώ θα ήθελα να πω και σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας, μεταδιδάκτορες, διδακτορικούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές, για την άψογη συνεργασία, το ευχάριστο και οικογενειακό κλίμα εντός του εργαστηρίου καθώς και την παρέα και φιλία τους όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα μέσα από την καρδιά μου να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στους λατρεμένους μου γονείς Κωνσταντίνο και Κατερίνα, στα αδέρφια μου Βαγγέλη και Νικόλα, στον σύντροφό μου Βασίλη και στους φίλους μου, οι οποίοι με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας και με βοήθησαν να ξεπεράσω κάθε ψυχολογικό εμπόδιο και δυσκολία, και που πίστεψαν στις ικανότητές μου ενθαρρύνοντάς με σε κάθε μου βήμα.

Αγγελική Καραγιώτα

Στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Κατερίνα,
που αποτελούν το μεγαλύτερο στήριγμά μου σε κάθε μου βήμα

Στους καθηγητές μου, κ. Ηλία Μυλωνή και κ. Γεωργία Χαχάμη

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ονοματεπώνυμο : **Καραγιώτα Αγγελική**

Ημερομηνία γέννησης : 25-02-1990

Διεύθυνση: Παλαιολόγου 92, Καρδίτσα

Τηλέφωνο επικοινωνίας : 2410-685583 & 6981824690

e-mail: akaragi@med.uth.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ

Φεβρουάριος 2015 - Νοέμβριος 2018: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Η. Μυλωνή, Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας

Οκτώβριος 2013 - Οκτώβριος 2014: Εκπόνηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» με ειδίκευση στη Βιοχημεία, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Βαθμός 9,60 «Άριστα»)

Σεπτέμβριος 2007 - Μάρτιος 2012: Φοίτηση στο Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Α.Π.Θ. (Βαθμός πτυχίου 7,27 «Λίαν καλώς»)

2007: Αποφοίτηση από το 4ο Γενικό Λύκειο Καρδίτσας (Βαθμός απολυτηρίου 19 «Άριστα»)

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ/ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Φεβρουάριος 2015 - Νοέμβριος 2018: Διδακτορική διατριβή με θέμα «Η σημασία των μηχανισμών μετά-μεταφραστικής τροποποίησης των πρωτεϊνών για την κυτταρική απόκριση στην υποξία και την εμπλοκή της στην καρκινογένεση» (ως υπότροφος του ΙΚΥ από Δεκέμβριο 2016 – Νοέμβριο 2018)

Μάρτιος 2015 - Οκτώβριος 2015: Απασχόληση ως Υποψήφια Διδάκτωρ με σύμβαση έργου στο ερευνητικό πρόγραμμα «ΑΡΙΣΤΕΙΑ II» με τίτλο «Στόχευση των επαγόμενων από υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF στη φλεγμονή και τον καρκίνο» (HYPOXYTARGET 3129), με επιστημονικό υπεύθυνο τον Καθηγητή Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γ. Σίμο.

Φεβρουάριος 2014 - Οκτώβριος 2014: Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με τίτλο «Μελέτη του ρόλου της φωσφορυλίωσης στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη δραστηριότητα του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1α (HIF-1α)», στα πλαίσια του μεταπτυχιακού

Σεπτέμβριος 2010 - Οκτώβριος 2012: Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με τίτλο «Προσδιορισμός βακτηριοσινών του προβιοτικού βακτηρίου *Bacillus subtilis* με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης –

HPLC», στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Τομέας Γενετικής Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Α.Π.Θ., υπό την επίβλεψη της κ. Μ. Τουράκη, Λέκτορα

Οκτώβριος 2011 - Νοέμβριος 2011: Εκπόνηση πρακτικής άσκησης με αντικείμενο την Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή στο Προηγμένο Ιατρικό Κέντρο ΙΑΚΕΝΤΡΟ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Angeliki Karagiota**, Maria Kourti, George Simos and Ilias Mylonis. HIF-1 α -derived cell-penetrating peptides inhibit ERK-dependent activation of HIF-1 and trigger apoptosis of cancer cells under hypoxia. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2018**, DOI: 10.1007/s00018-018-2985-7.
2. **Angeliki Karagiota**, Ilias Mylonis, George Simos and Georgia Chachami. Protein phosphatase PPP3CA (calcineurin A) down-regulates hypoxia-inducible factor transcriptional activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2019**, DOI: 10.1016/j.abb.2019.02.007.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **Karagiota A., Touraki M.** (2013) Quantitative determination of the bacteriocins produced by the potential probiotic *Bacillus subtilis* NCIMB 3610 using turbidometric analysis and HPLC. Proceedings of the 35th Scientific Conference of Hellenic Association for Biological Sciences Nafplio, May 23-25, 2013, 137.
2. **Angeliki Karagiota, George Simos, Ilias Mylonis** (2014) Functional analysis of Flag-tagged HIF-1 α forms carrying mutations inside their ERK-targeted domain. Abstract book, 2^o Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημόνων Θεσσαλονίκη, Νοέμβριος 27, 2014, 47.
3. **Angeliki Karagiota, George Simos, Ilias Mylonis** (2014) Functional analysis of Flag-tagged HIF-1 α forms carrying mutations inside their ERK-targeted domain. Book of Abstracts of the 65th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology Thessaloniki, November 28-30, 2014, 134.
4. **Mylonis I., Kourti M., Karagiota A., Simos G** (2015) Development of peptide inhibitors that target the ERK-dependent function of HIF-1 α . The FEBS Journal Supplement 1 of the 40th Congress of the Federation of the European Biochemical Societies Berlin - Germany, July 4-9, 2015, 287.
5. **Angeliki Karagiota, Maria Kourti, George Simos, Ilias Mylonis** (2016) Cell permeable peptides that inhibit activation of HIF-1 α by ERK block cancer cell growth under hypoxia. Book of abstracts, 4^o Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημών, Ιωάννινα, Νοέμβριος 24, 2016, 77.
6. **Angeliki Karagiota, Maria Kourti, George Simos, Ilias Mylonis** (2016) Cell permeable peptides that inhibit activation of HIF-1 α by ERK block cancer cell growth under hypoxia.

Book of abstracts of the 67th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology Ioannina, November 25-27, 2016, 129.

7. **A. Karagiota, M. Kourti, G. Simos, I. Mylonis** (2017) Inhibition of HIF-1 α phosphorylation by cell-penetrating peptides impairs metabolic adaptation and triggers apoptosis of cancer cells under hypoxia. Book of abstracts of the 68th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology Athens, November 10-12, 2017, A10 (**Oral presentation**).
8. **Angeliki Karagiota, Ilias Mylonis, George Simos and Georgia Chachami** (2017) The role of de-phosphorylation in the regulation of HIF-1 α expression and activity. Book of abstracts of the 68th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology Athens, November 10-12, 2017, P38.
9. **A. Karagiota, M. Kourti, G. Simos, I. Mylonis** (2018) Cell-penetrating peptides inhibiting ERK-dependent activation of HIF1 α reduce survival and induce apoptosis of cancer cells under hypoxia. Abstract book of the 18th FEBS Young Scientists' Forum, Prague – Czech Republic, July 4-7, 2018, 52.
10. **A. Karagiota, M. Kourti, G. Simos, I. Mylonis** (2018) Cell-penetrating peptides inhibiting ERK-dependent activation of HIF1 α reduce survival and induce apoptosis of cancer cells under hypoxia. The 43rd FEBS Congress BIOCHEMISTRY FOREVER Prague 2018, FEBS openBIO Supplement 1, July 2018, 211.
11. **Angeliki Karagiota, Ilias Mylonis, George Simos and Georgia Chachami** (2018) Protein phosphatase PDP1 regulates HIF activity. Abstracts Book of the 69th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology Larissa, November 23-25, 2018, 172.

ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

1. **ΑΓΓΛΙΚΑ:** Certificate of Competency in English, University of Michigan, 2004
2. **ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ:** Πολύ καλό επίπεδο, κάτοχος πιστοποιητικού γνώσης χειρισμού Ηλεκτρονικών Υπολογιστών του University Of Cambridge - International Examinations, IT Skills Standard και πιστοποιητικού ECDL

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

09/12/2016 – 09/12/2018: Υποτροφία για διδακτορικές σπουδές από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (IKY).

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

2014 - σήμερα: Αρωγό μέλος της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB)

2016: Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του 4^{ου} Πανελλήνιου Forum Νέων Επιστημόνων της ΕΕΒΜΒ που πραγματοποιήθηκε στις 24 Νοεμβρίου 2016, στα πλαίσια του 67^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου της ΕΕΒΜΒ, Ιωάννινα

2018: Πρόεδρος της οργανωτικής επιτροπής του 6^{ου} Πανελλήνιου Forum Νέων Επιστημόνων της ΕΕΒΜΒ που πραγματοποιήθηκε στις 22 Νοεμβρίου 2018, στα πλαίσια του 69^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου της ΕΕΒΜΒ, Λάρισα

**«Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ
ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ ΣΤΗΝ
ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ»**

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΚΑΡΑΓΙΩΤΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ηλίας Μυλωνής**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
2. **Γεώργιος Σίμος**, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Γεωργία Χαχάμη**, Λέκτορας Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υποξία (έλλειψη οξυγόνου) είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των στερεών όγκων και μέσω της ενεργοποίησης των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων (HIF) προκαλεί προσαρμοστικές μεταβολές που προωθούν την εξέλιξη του καρκίνου. Οι HIF έχουν συσχετιστεί με την προαγωγή του καρκίνου και θεωρούνται ελκυστικοί στόχοι για την ανάπτυξη αντικαρκινικών θεραπειών. Οι εξαρτώμενες από το οξυγόνο υπομονάδες HIF-α ελέγχονται και από άλλους μηχανισμούς που βασίζονται στη φωσφορυλίωση. Παρόλο που αρκετές κινάσες έχει δείχθει ότι ρυθμίζουν τους HIF-α, οι αντίστοιχες πιθανές φωσφατάσες που αντισταθμίζουν τη δράση τους παρέμεναν μέχρι τώρα άγνωστες.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία διαλογής φωσφατασών με πειράματα αποσιώπησης μέσω siRNA, η οποία αποκάλυψε ότι οι φωσφατάσες PPP3CA (καλσινευρίνη), που εξαρτάται από το ασβέστιο, και PDP1 (φωσφατάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού 1), που αποφωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH), επηρεάζουν την ενεργότητα των HIF σε συνθήκες υποξίας (1% O₂), σε καρκινικά κύτταρα HeLa. Αποδείχθηκε πειραματικά ότι η PPP3CA αναστέλλει τους HIF, καθώς η υπερέκφραση ή η ενεργοποίησή της με ιονομυκίνη μείωσε τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF στην υποξία, χωρίς να μεταβάλλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-α, τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α ή τη σύνδεσή του με τον HIF-β. Αντίθετα, η υπερέκφραση της PDP1, παρά τον εντοπισμό της στα μιτοχόνδρια, αύξησε τη δράση του HIF-1 κατά την υποξία, γεγονός που επέτρεψε, πιθανόν μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης, τη διατήρηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της PDH εξαιτίας της επαγωγής της κινάσης PDK1 από τον HIF-1. Ωστόσο, σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης δεν παρατηρήθηκε δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του HIF-1α και της PPP3CA ή της PDP1, υποδεικνύοντας ότι οι δύο φωσφατάσες δε δρουν άμεσα στους HIF-α, αλλά ρυθμίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα των HIF μέσω ενός έμμεσου μηχανισμού.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, μελετήθηκε ο ρόλος της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2, μέσω της αναστολής του HIF-1 με τη χρήση πεπτιδίων που περιέχουν αμινοξικές αλληλουχίες του HIF-1α και μπορούν να εμποδίσουν τη φωσφορυλίωση του από τις κινάσες ERK1/2. Με βάση προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ., σύμφωνα με τις οποίες η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 στα κατάλοιπα Ser641 και Ser643 αυξάνει τη δραστηριότητά του παρεμποδίζοντας την εξαγωγή του από τον πυρήνα, έγινε σχεδίαση, κλωνοποίηση, υπερέκφραση σε βακτήρια και

απομόνωση σε καθαρή μορφή πεπτιδίων που περιέχουν τη φυσική αλληλουχία της περιοχής ETD (ERK1/2 Targeted Domain, αμινοξέα 616-658) του HIF-1α ή μορφές της ETD που έφεραν μεταλλάξεις που καταστρέφουν τις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις κινάσες ERK1/2 (ETD-SA) ή μιμούνται τη φωσφορυλίωση αυτή (ETD-SE) ή καταστρέφουν το σήμα πυρηνικής εξαγωγής του HIF-1α (ETD-IA). Τα πεπτίδια αυτά έφεραν επίσης στο αμινοτελικό τους άκρο την αλληλουχία TAT του ιού HIV, που προσδίδει ικανότητα διείσδυσης στα κύτταρα, και στο καρβοξυτελικό τους άκρο τον επίτοπο Flag, που επιτρέπει την ανίχνευσης τους με ειδικό αντίσωμα. Όταν τα πεπτίδια αυτά προστέθηκαν στο μέσο καλλιέργειας κυττάρων ηπατοκαρκινώματος Huh7 σε συνθήκες υποξίας (1% O₂), εισήλθαν στο εσωτερικό των κυττάρων, και όλα, εκτός από το ETD-SA, συσσωρεύτηκαν στον πυρήνα, προκάλεσαν τη μετατόπιση του ενδογενούς HIF-1α στο κυτταρόπλασμα, μείωσαν τη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1 και εμπόδισαν την έκφραση γονιδίων-στόχων του HIF-1, χωρίς όμως να επηρεάσουν την έκφραση γονιδίων-στόχων του HIF-2. Επίσης τα πεπτίδια TAT-ETD που εντοπίζονται στον πυρήνα ανέστειλαν τη μεταβολική προσαρμογή, τη μετανάστευση και την ικανότητα σχηματισμού αποικιών των καρκινικών κυττάρων και αύξησαν το θάνατό τους ενεργοποιώντας την απόπτωση, αποκλειστικά κάτω από συνθήκες υποξίας. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν τη σημασία της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2 για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας και επιπλέον, προτείνουν τη χρήση των κυτταροδιεισδυτικών πεπτιδίων TAT-ETD ως έναν αποτελεσματικό τρόπο για την ειδική αναστολή της δράσης του HIF-1 και των εξαρτώμενων από τον HIF-1 βιολογικών λειτουργιών, που επιτρέπουν τόσο την κυτταρική προσαρμογή στη υποξία, όσο και την ανάπτυξη των στερεών όγκων.

SUMMARY

Hypoxia (oxygen deprivation) is a typical aspect of solid tumors and evokes changes that promote cancer, mainly by activating a small family of transcriptional activators called Hypoxia Inducible Factors (HIFs). HIFs have indeed been associated with tumorigenesis and are, therefore, considered valid targets of anticancer therapy. The oxygen-sensitive HIF- α subunit is additionally controlled by mechanisms involving phosphorylation. Although several kinases are known to regulate HIF- α , the corresponding counteracting phosphatases remain so far unknown.

The first part of this thesis concerns the identification of phosphatases that regulate HIF activity. A phosphatome siRNA screening was performed and revealed that two phosphatases, PPP3CA (calcineurin), a calcium-dependent phosphatase, and PDP1 (Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase 1), an activator of pyruvate dehydrogenase, affect HIF-dependent transcriptional activity in HeLa cells under hypoxia (1% O₂). Additional experiments showed that PPP3CA inhibits HIF activity, since its overexpression or its activation by ionomycin reduced HIF transcriptional activity under hypoxic conditions, without affecting HIF- α protein levels, HIF-1 α subcellular localization or its association with HIF-1 β . On the other hand, overexpression of PDP1, despite its localization in mitochondria, enhanced HIF-1 activity, which, probably through feedback inhibition, allowed preservation of the phosphorylation levels of PDH by HIF-1-dependent induction of PDK1. However, immunoprecipitation studies did not show any physical interaction between HIF-1 α and PPP3CA or PDP1, suggesting that both phosphatases do not directly act on HIF-1 α but regulate HIF activity indirectly.

The second part of this thesis investigated the possibility to impair the adaptation of cancer cells to hypoxia using HIF-1 α -derived peptides that inhibit its phosphorylation by ERK. Following previous studies by the Laboratory of Biochemistry (Faculty of Medicine, University of Thessaly) demonstrating that phosphorylation of HIF-1 α by ERK1/2 at Ser641 and Ser643 stimulates HIF-1 α activity by blocking its nuclear export, peptides containing the wild-type sequence of the HIF-1 α ETD (ERK1/2-Targeted Domain, amino acids 616-658) or ETD forms carrying mutations that destroyed the ERK sites (ETD-SA) or mimicked phosphorylation by ERK (ETD-SE) or destroyed the HIF-1 α nuclear export signal (ETD-IA) were designed, cloned, overexpressed in bacteria and purified. These peptides also contained an N-terminal HIV-derived TAT sequence, allowing penetration inside cells and a C-terminal

Flag epitope, allowing their detection by specific antibodies. When these peptides were added in the culture medium of hepatocarcinoma Huh7 cells grown under hypoxia (1% O₂), they entered the cells and all forms, except ETD-SA, were localized inside the nucleus, caused HIF-1 α mislocalization to the cytoplasm, significantly reduced HIF-1 activity and impaired the induction of HIF-1 target genes, without, however, affecting the expression HIF-2 specific gene targets. Furthermore, the nuclear TAT-ETD peptides inhibited the metabolic adaptation, migration and colony formation of cancer cells and triggered their apoptotic death exclusively under hypoxia. Taken together, these data demonstrate the importance of ERK-mediated modification of HIF-1 α for cancer cell survival under hypoxia and, in addition, suggest that cell-penetrating TAT-ETD peptides can be used as specific inhibitors of HIF-1 activity and HIF-1-dependent processes required for cellular adaptation to hypoxia and solid tumor growth.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AGPAT: 1-acyldlycerol-e-phosphat-O-acyltransferase, ακυλοτρανσφεράση της 3-φωσφορικής ακυλογλυκερόλης

ARD1: arrest defective protein-1

ARNT: Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη

bHLH: basic helix-loop-helix, βασική περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας

BSA: Αλβουμίνη ορού βοδιού

CBP: CREB binding protein, πρωτεΐνη πρόσδεσης στον CREB

CIP: calf-intestinal alkaline phosphatase, αλκαλική φωσφατάση εντέρου μοσχαριού

cDNA: συμπληρωματικό DNA

CK: casein kinase, κινάση καζεΐνης

CMV: Cytomegalovirus

CnA: καταλυτική υπομονάδα της καλσινευρίνης

CnB: ρυθμιστική υπομονάδα της καλσινευρίνης

DAG: diacylglycerol, διακυλογλυκερόλη

DAPI: 4', 6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλιο

DGAT: diglyceride acyltransferase, ακυλοτρανσφεράση των διγλυκεριδίων

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMOG: dimethyloxaloglycine, διμεθυλοξαλογλυκίνη

DMSO: dimethylsulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο

DNA: deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

DTT: dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EMT: epithelial-mesenchymal transition, μετάβαση από τον επιθηλιακό στο μεσεγχυματικό φαινότυπο

EPO: ερυθροποιητίνη

ER: endoplasmic reticulum, ενδοπλασματικό δίκτυο

ERK: extracellular signal-regulated kinase, κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα

FABP: fatty acid binding protein, πρωτεΐνη πρόσδεσης σε λιπαρά

FASN: fatty acid synthase, συνθάση των λιπαρών οξέων

FBS: ορός εμβρύου βοός

FIIH: παράγοντας που αναστέλλει τον HIF
 FGFR: fibroblast growth factor receptor, υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών
 FSP-1: fibroblast-specific protein 1, ειδική πρωτεΐνη των ινοβλαστών 1
 GLUT-1: glucose transporter 1, μεταφορέας της γλυκόζης 1
 GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase, ακυλοτρανσφεράση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης
 GST: τρανσφεράση της γλουταθειόνης
 Hepes: N-2-υδροξυαιθυλ-πιπεραζιν-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
 HIF: hypoxia-inducible factor, παράγοντας επαγόμενος από την υποξία
 HK: hexokinase, εξοκινάση
 HRE: hypoxia-response element, στοιχείο απόκρισης στην υποξία
 Hsp: heat-shock protein, πρωτεΐνη θερμικού σοκ
 INF: interferon, ιντερφερόνη
 IL-6: Ιντερλευκίνη 6
 IPTG: Ισοπροπυλ-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοζίδιο
 LB: Luria Broth
 LD: lipid droplet, λιποσταγονίδιο
 LDH: lactate dehydrogenase, γαλακτική αφυδρογονάση
 LOX: lysyl oxidase, οξειδάση λυσίνης
 LPA: lysophosphatidic acid, λυσοφωσφατιδικό οξύ
 MPAK: mitogen-activated protein kinase, κινάσες πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα
 MMP: matrix metalloproteinase, μεταλλοπρωτεϊνάση της εξωκυττάριας ουσίας
 mTOR: Στόχος της ραπαμυκίνης
 NES: Nuclear Export Signal, σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα
 NF-κB: Nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells, πυρηνικός παράγοντας ενίσχυσης της κάπα-ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων
 NLS: Nuclear Localization Signal, σήμα πυρηνικού εντοπισμού
 ODDD: oxygen-dependent degradation domain, περιοχή οξυγόνο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης
 PA: phosphatidic acid, φωσφατιδικό οξύ
 PAI-1: Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1
 PAS: Per-Arnt-Sim

PBS: phosphate buffer saline, διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων

PCR: polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PDK1: pyruvate dehydrogenase kinase 1, κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού 1

PDP1: pyruvate dehydrogenase phosphatase 1, φωσφατάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού 1

PGK: Κινάση του φωσφογλυκερινικού οξέος

PHD: prolyl hydroxylase, πρόλυλο-υδροξυλάση

PI3K: Κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης

PMSF: phenyl methyl sulfonyl fluoride, φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο.

PTEN: phosphatase and tensin homolog, ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης

P4HA1: A1 υπομονάδα της 4-πρόλυλο-υδροξυλάσης του κολλαγόνου

RNA: Ριβονουκλεϊνικό οξύ

ROS: Ενεργές ρίζες οξυγόνου

SDS: Δωδεκάκιλο-θειικό νάτριο

Stat3: signal transducer and activator of transcription 3, μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3

SUMO: Small ubiquitin-like modifier, μικρός τροποποιητής τύπου ουβικιτίνης

SV40: Simian Virus 40

TAD: trans-activation domain, περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής

TAE: Tris-οξικό οξύ-EDTA

TGs: triglycerides, τριγλυκερίδια

TGF- α : transforming growth factor α , αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού α

TEMED: N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη

TNF- α : Παράγοντας νέκρωσης όγκων

Tris: Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο

VEGF: Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων

VHL: von Hippel-Lindau

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	12
SUMMARY	14
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	16
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	24
A.1 Η υποξία	24
A.2 Η οικογένεια των παραγόντων που επάγονται από την υποξία (Hypoxia Inducible Factors, HIF)	24
A.2.1 Η δομή των παραγόντων HIF	26
A.2.2 Ο φυσιολογικός ρόλος των HIF και η διαφορική ρύθμιση της μεταγραφής από τους HIF-1α και HIF-2α	29
A.3 Η ρύθμιση των HIF-α	33
A.3.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση των HIF-α	33
A.3.2 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση των HIF-α	35
A.3.2.1 Ρύθμιση του HIF-1α από σηματοδοτικά μονοπάτια	36
A.3.2.1.1 Ρύθμιση της μεταγραφής του HIF-1α	36
A.3.2.1.2 Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α	37
A.3.2.1.3 Ρύθμιση του HIF-1α από δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), μεταβολίτες και μη κωδικεύοντα μόρια RNA	39
A.3.2.2 Ρύθμιση του HIF-1α μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες	42
A.3.2.3 Ρύθμιση του HIF-1α μέσω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων	45
A.3.2.4 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης	53
A.4 Έλεγχος της δράσης του HIF-1α από τις ERK1/2	54
A.5 Ρύθμιση του HIF-1 από φωσφατάσες	57
A.6 Οι υπό μελέτη φωσφατάσες	59
A.6.1 Η φωσφατάση καλσινευρίνη (PPP3CA, CnA)	59
A.6.2 Η φωσφατάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PPM2C, PDP1)	65
A.7 Σχέση υποξίας, HIF-1α και καρκίνου	71
A.8 Θεραπευτική στόχευση του μονοπατιού υποξίας-HIF-1	79
A.8.1 Ουσίες που στοχεύουν άμεσα τον HIF-1α	80

A.8.2 Ουσίες που στοχεύουν σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τους HIF	82
A.8.3 Χρήση πεπτιδίων για τη στόχευση του HIF-1α	86
A.9 Η τεχνολογία της πρωτεϊνικής μεταγωγής	87
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	91
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	93
B.1 ΥΛΙΚΑ	93
B.1.1 Κυτταρικές σειρές	93
B.1.2 Βακτηριακά στελέχη	93
B.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς	93
B.1.4 Εκκινητές, ολιγονουκλεοτίδια και small interfering RNA (siRNA)	97
B.1.5 Αλληλούχιση (Sequencing)	99
B.1.6 Χημικές ενώσεις-Αντιδραστήρια	99
B.1.7 Υλικά Μοριακής Βιολογίας	99
B.1.8 Αντισώματα	99
B.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	101
B.2.1 Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς	101
B.2.1.1 Ενίσχυση τμημάτων γονιδίων (DNA) με PCR	101
B.2.1.2 Πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού	103
B.2.1.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	104
B.2.1.4 Εξαγωγή και καθαρισμός των τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης	105
B.2.1.5 Αντίδραση λιγάσης	105
B.2.1.6 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent)	106
B.2.1.7 Μετασχηματισμός E.coli Top10 και E.coli BL21RIL	106
B.2.1.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (Mini Preparation)	107
B.2.2 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG	108
B.2.3 Καθαρισμός των GST-tagged πρωτεϊνών με χρωματογραφία αχιστείας και απομάκρυνση του GST επιτόπου	109
B.2.3.1 Απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα κύτταρα BL21RIL	109
B.2.3.2 Καθαρισμός των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG	109
B.2.4 Καθαρισμός των His-tagged πρωτεϊνών με χρωματογραφία ιόντων μετάλλου (Ni-NTA)	111
B.2.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford	112

B.2.6 Κυτταροκαλλιέργειες	112
B.2.7 Πάγωμα και απόψυξη των κυττάρων για επανέναρξη καλλιιεργειών	112
B.2.8 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων	113
B.2.9 Αποσιώπηση της έκφρασης με siRNA	114
B.2.10 Συνθήκες επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α και επίδραση ουσιών στα κύτταρα	116
B.2.11 Επίδραση στα καρκινικά κύτταρα με τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG	116
B.2.12 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος	116
B.2.13 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση	117
B.2.14 Χρώση πρωτεϊνών στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου με Coomassie Brilliant Blue	118
B.2.15 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	118
B.2.16 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών	120
B.2.17 Βιοχημική κλασμάτωση	121
B.2.18 Μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό και φθορισμό, παρατήρηση μιτοχονδρίων και λιποσταγονιδίων	121
B.2.19 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF	123
B.2.20 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του	124
B.2.21 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time, qRT-PCR)	125
B.2.22 Δοκιμασία επούλωσης τραύματος (wound healing assay)	127
B.2.23 Δοκιμασία κλωνογονικότητας (clonogenic assay)	127
B.2.24 Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού	128
B.2.25 Μέτρηση κυτταρικού θανάτου	129
B.2.26 Μελέτη της αποδιοργάνωσης της κυτταρικής μεμβράνης (Annexin V assay)	129
B.2.27 Μέτρηση της ενεργότητας των εκτελεστικών κασπασών 3 και 7.....	130
B.2.28 Μελέτη της βλάβης του DNA (TUNEL assay - terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)	131
B.2.29 Στατιστική ανάλυση.....	132
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	133
Γ.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ HIF-α	133
Γ.1.1 Ταυτοποίηση φωσφατασών που επηρεάζουν τη δράση των HIF σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα	133

Γ.1.2 Διερεύνηση του ρόλου της καλσινευρίνης (PPP3CA) στη ρύθμιση των HIF	138
Γ.1.2.1 Μελέτη της αποσιώπησης της PPP3CA στην ενεργότητα των HIF	138
Γ.1.2.2 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης των διαφόρων μορφών της PPP3CA, στη ρύθμιση των HIF σε συνθήκες υποξίας	141
Γ.1.2.3 Μελέτη της επίδρασης της ιονομυκίνης στη ρύθμιση των HIF	144
Γ.1.2.4 Η ιονομυκίνη αναστέλλει τη δράση των HIF μέσω της PPP3CA	148
Γ.1.2.5 Επίδραση κυττάρων HeLa με ιονομυκίνη μετά από υπερέκφραση της PPP3CA	149
Γ.1.2.6 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της PPP3CA με τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας	152
Γ.1.3 Ο ρόλος της φωσφατάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDP1) στη ρύθμιση των HIF	154
Γ.1.3.1 Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης της PDP1 στη ρύθμιση της δράσης των HIF σε συνθήκες υποξίας	154
Γ.1.3.2 Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης της PDP1 στη σταθερότητα και τον εντοπισμό των HIF σε συνθήκες υποξίας	156
Γ.1.3.3 Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης της PDP1 στον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT	158
Γ.1.3.4 Διερεύνηση του ρόλου της αποσιώπησης της PDP1 στη λειτουργία του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, σε συνθήκες υποξίας	159
Γ.1.3.5 Κλωνοποίηση του γονιδίου της PDP1 στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N3	161
Γ.1.3.6 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της PDP1-GFP στη ρύθμιση των HIF και στη λειτουργία του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, σε συνθήκες υποξίας	164
Γ.1.3.7 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της PDP1 με τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας	165
Γ.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΠΟΞΙΑΣ, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ, ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ETD (ERK TARGETED DOMAIN) ΤΟΥ HIF-1α	167
Γ.2.1 Κατασκευή και καθαρισμός των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG	169
Γ.2.1.1 Κλωνοποίηση του cDNA των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1	169

Γ.2.1.2 Καθαρισμός των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG	171
Γ.2.2 Έλεγχος της ικανότητας διείσδυσης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG σε κύτταρα Huh7 και της επίδρασής τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF	173
Γ.2.3 Μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στο εσωτερικό των κυττάρων και της επίδρασής τους στον εντοπισμό του HIF-1α	175
Γ.2.4 Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1	177
Γ.2.5 Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στο σχηματισμό λιποσταγονιδίων	179
Γ.2.6 Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων Huh7	181
Γ.2.7 Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στη ν ικανότητα των καρκινικών κυττάρων Huh7 να σχηματίζουν αποικίες	182
Γ.2.8 Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στον πολλαπλασιασμό και το θάνατο των καρκινικών κυττάρων Huh7	183
Γ.2.9 Έλεγχος της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στην ενεργοποίηση της απόπτωσης	185
Γ.2.10 Έλεγχος της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD(SA/IA)-FLAG σ τον κυτταρικό θάνατο και την ενεργοποίηση της απόπτωσης σε κύτταρα HeLa και HepG2	188
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	191
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	206
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	224

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 Η υποξία

Ως υποξία ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία τα διαθέσιμα επίπεδα οξυγόνου μειώνονται σημαντικά σε κύτταρα ή ιστούς. Η έλλειψη οξυγόνου συναντάται σε φυσιολογικές συνθήκες, όπως είναι η παραμονή σε μεγάλο υψόμετρο ή κατά την έντονη σωματική άσκηση. Θεωρείται απαραίτητο ερέθισμα για την επίτευξη σημαντικών λειτουργιών του ανθρώπινου οργανισμού, όπως είναι η ομαλή εμβρυογένεση, η διατήρηση της πολυδυναμίας των στελεχιαίων κυττάρων και η ερυθροποίηση. Η υποξία χαρακτηρίζει όμως και πολλές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων των πνευμονικών παθήσεων, των ισχαιμιών και του καρκίνου. Όσον αφορά στον καρκίνο, οι στερεοί όγκοι συχνά εμφανίζουν υποξικές περιοχές, εξαιτίας της δημιουργίας ανισορροπιών μεταξύ της απαίτησης των κυττάρων για οξυγόνο και της προμήθειας οξυγόνου από τα αγγεία. Η υποξία εμφανίζεται σε προχωρημένα στάδια της ανάπτυξης ενός όγκου, όταν εξαιτίας του αυξημένου πολλαπλασιασμού και της συσσώρευσης των κυττάρων, δημιουργείται κακή αγγείωση στο κέντρο του όγκου (1). Η παρατεταμένη έκθεση σε πλήρη απουσία οξυγόνου, κατάσταση που ονομάζεται ανοξία, οδηγεί σε νέκρωση των κυττάρων.

Προκειμένου να επιβιώσουν, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει προσαρμοστικούς μηχανισμούς στην έλλειψη οξυγόνου. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού ώστε να λειτουργεί στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, την παραγωγή ερυθροκυττάρων και την αγγειογένεση ώστε να συντελείται επαρκής οξυγόνωση των κυττάρων και την ανθεκτικότητα στην απόπτωση. Οι προσαρμοστικές αυτές μεταβολές επάγονται από την υποξία, η οποία διεγείρει έναν καταρράκτη διαδοχικών γεγονότων. Τα υποξικά κύτταρα διέρχονται από μια πρώιμη και ταχεία φάση, κατά την οποία μεταβάλλεται η δραστηριότητα διαφόρων ενζύμων και επάγονται οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις πολλών μορίων. Η φάση αυτή ακολουθείται από μια χρόνια κατάσταση, η οποία περιλαμβάνει αλλαγές στη λειτουργιών των πρωτεϊνών, στη μεταγραφή γονιδίων και την πρωτεϊνοσύνθεση (2).

A.2 Η οικογένεια των παραγόντων που επάγονται από την υποξία, (Hypoxia Inducible Factors, HIF)

Οι βασικοί τελεστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία, είναι τα μέλη της οικογένειας των παραγόντων που επάγονται από την υποξία, HIF (Hypoxia Inducible

Factors). Πρόκειται για μεταγραφικούς ενεργοποιητές, οι οποίοι επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων, διαμεσολαβούν την πραγματοποίηση των προσαρμοστικών αλλαγών σε συνθήκες υποξίας, τόσο φυσιολογικών όσο και μεταμορφωμένων κυττάρων (3). Οι HIF διαθέτουν μια δομική επικράτεια έλικας-θηλιάς-έλικας, μέσω της οποίας δεσμεύονται στο DNA, που τους κατατάσσει στην ευρύτερη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων bHLH – PAS (basic Helix-Loop-Helix - Per-ARNT-Sim) (4). Συνιστούν ετεροδιμερή σύμπλοκα, αποτελούμενα από μια β-υπομονάδα η οποία εκφράζεται σταθερά, και μια α-υπομονάδα, η σταθεροποίηση της οποίας ελέγχεται αυστηρά από τα επίπεδα του οξυγόνου. Έχουν βρεθεί 3 ισομορφές της α-υπομονάδας, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Ο HIF-1α χαρακτηρίστηκε πρώτη φορά από τον Semenza και τους συνεργάτες του, το 1995, ως πυρηνικός παράγοντας 826 αμινοξέων, που σχηματίζει σύμπλοκο με τον HIF-β ή ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) και δεσμεύεται στο DNA ως απόκριση σε συνθήκες υποξίας (5), (6). Αρκετά σύντομα ανακαλύφθηκε ο HIF-2α ή EPAS όπως αρχικά ονομάστηκε, από πολλές διαφορετικές ομάδες (7), (8), (9). Η αλληλουχία του HIF-2α έχει μέγεθος 870 αμινοξέων και εμφανίζει μεγάλη ομολογία με του HIF-1α. Ο HIF-2α λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας κατά παρόμοιο τρόπο, ετεροδιμεριζόμενος με τον ARNT στην υποξία και η έκφραση του, σε αντίθεση με τον HIF-1α, είναι ιστοειδική και περιορίζεται κυρίως στο ήπαρ, πνεύμονες, νεφρούς, καρδιά, εγκέφαλο και έντερο (10). Η τρίτη ισομορφή που περιγράφηκε, HIF-3α, είναι λιγότερο μελετημένη. Παρουσιάζει πολύ μικρότερη ομοιότητα με τις άλλες δύο ισομορφές και διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά (11). Η έκφρασή της περιορίζεται σε ιστούς όπως η καρδιά, οι πνεύμονες και οι νεφροί (12). Διαθέτει πολλά εναλλακτικά ματισμένα μετάγραφα (τουλάχιστον 6), με το HIF-3α4 (IPAS) να μην είναι οξυγόνο-ευαίσθητο, να μην λειτουργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής, αλλά να ρυθμίζει αρνητικά τον HIF-1α, παρεμποδίζοντας το διμερισμό του με τον ARNT και τη δέσμευση στο DNA (13), (14), (15), (16) (Εικόνα 1).

Ο HIF-β είναι μια πρωτεΐνη 789 αμινοξέων για την οποία έχουν περιγραφεί δύο ισομορφές (ARNT, ARNT2) (17). Διαθέτει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που ρυθμίζει την είσοδό του στον πυρήνα μέσω αλληλεπίδρασης με τις ιμπορτίνες α/β (18). Ο ARNT συμμετέχει σε δύο διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια ως απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες: στην οδό του υποδοχέα AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) σε συνθήκες έκθεσης σε διοξίνες και στην οδό των HIF σε συνθήκες υποξίας (19). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο ARNT δεν επηρεάζεται από την υποξία και η έκφρασή του είναι συνεχής και σταθερή, ανεξάρτητα από τα επίπεδα του οξυγόνου. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες που υποστηρίζουν ότι

ο ARNT ρυθμίζεται από την υποξία σε συγκεκριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές, υποδεικνύοντας ένα καινούριο ρόλο του ARNT στην ογκογένεση (20, 21).

Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, η α -υπομονάδα αποικοδομείται συνεχώς, αλλά σταθεροποιείται και συσσωρεύεται ταχύτατα μέσα στον πυρήνα όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Εκεί συναντά τον ARNT, με τον οποίο διμερίζεται και συγκροτεί ένα λειτουργικό σύμπλοκο. Προκειμένου να εκδηλώσουν τη δράση τους ως μεταγραφικοί παράγοντες, οι HIF δεσμεύονται στο DNA, σε συγκεκριμένες θέσεις, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia-Response Elements, HRE). Τα HRE αποτελούν το συντηρημένο μοτίβο 5'-(A/G)CGTG-3', και εντοπίζονται στους υποκινητές ή ενισχυτές των γονιδίων-στόχων της υποξίας. Μετά την πρόσδεση των HIF στα HRE, οι HIF- α προσελκύουν διάφορους συνενεργοποιητές, όπως είναι οι συμπαράγοντες της μεταγραφής, οι ακετυλο-τρανσφεράσες που πραγματοποιούν την ακετυλίωση των ιστονών, το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και η RNA πολυμεράση, προκειμένου να επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απαίτησης και της προμήθειας οξυγόνου στα κύτταρα (22). Παρότι το γονιδίωμα διαθέτει πληθώρα πιθανών HRE, μόνο στο 1% αυτών δεσμεύονται οι HIF, σύμφωνα με αναλύσεις ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης και αλληλούχισης (ChIP-Seq) (23), (24, 25), (26).

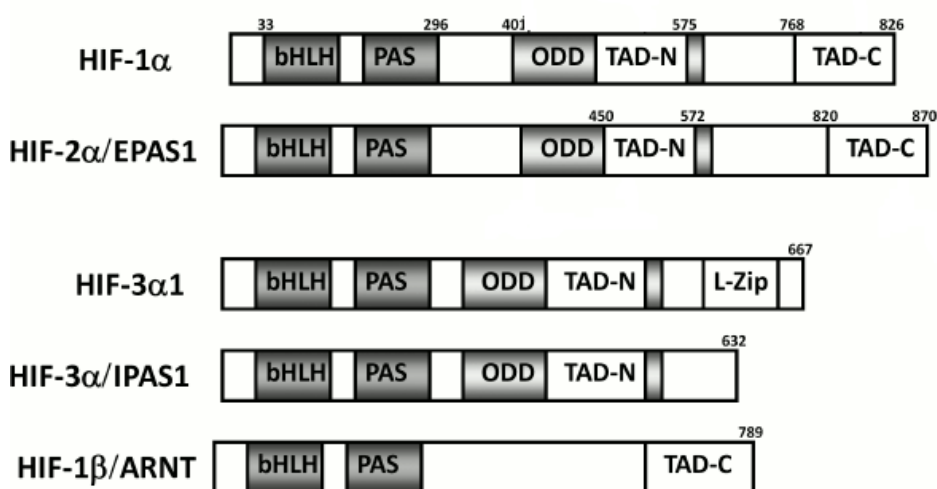
A.2.1 Η δομή των παραγόντων HIF

Τα μέλη της οικογένειας των HIF εμφανίζουν δομικά συντηρημένες επικράτειες. Οι 3 ισομορφές της α -υπομονάδας και ο ARNT διαθέτουν στο αμινοτελικό τους άκρο την περιοχή bHLH, η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνδεση με το DNA και τις περιοχές ετεροδιμερισμού PAS-A και PAS-B. Στο καρβοξυτελικό τους άκρο, οι HIF-1 α και HIF-2 α διαθέτουν δύο περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης, N-TAD και C-TAD (Transactivation Domains), στις οποίες δεσμεύονται συμπαράγοντες της μεταγραφής, όπως ο p300/CBP. Οι περιοχές αυτές διαμεσολαβούν την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων των HIF (Εικόνα 1). Οι περιοχές TAD διαχωρίζονται από μία ενδιάμεση περιοχή που καλείται ανασταλτική περιοχή (Inhibitory Domain, ID), η απομάκρυνση της οποίας οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας (27). Τέλος η α -υπομονάδα φέρει τη περιοχή οξυγόνο-εξαρτώμενης ρύθμισης, ODD (Oxygen-dependent Degradation Domain), η οποία αλληλεπικαλύπτεται εν μέρει με την περιοχή N-TAD (Εικόνα 1), (4).

Η περιοχή bHLH παρουσιάζει 85% ομοιότητα στην αλληλουχία μεταξύ των HIF- α υπομονάδων, ενώ οι περιοχές PAS είναι περίπου 70% ταυτόσημες μεταξύ των HIF-1 α και

HIF-2α. Συγκριτικά, οι bHLH και PAS περιοχές του HIF-3α έχουν αντίστοιχα 74% και 52-58% ομοιότητα με τους HIF-1α και HIF-2α (4).

Πολλές από τις ισομορφές του HIF-3α φέρουν την N-TAD, αλλά τους λείπει η C-TAD περιοχή. Πρόσφατες μελέτες στον οργανισμό zebrafish έδειξαν ότι η ισομορφή αυτή δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και ταυτοποιήθηκαν γονίδια στόχοι του, στα οποία προσδένεται σε άτυπα HRE (28). Παρόλα αυτά στο καρβοξυτελικό τους άκρο φέρουν ένα διαφορετικό δομικό μοτίβο (φερμουάρ λευκίνης, Εικόνα1) με άγνωστη έως τώρα λειτουργία (15), (16). Η καλύτερα χαρακτηρισμένη ισομορφή HIF-3α4 δεν έχει καθόλου TAD περιοχές και λειτουργεί όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ως αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1α (14), (15).

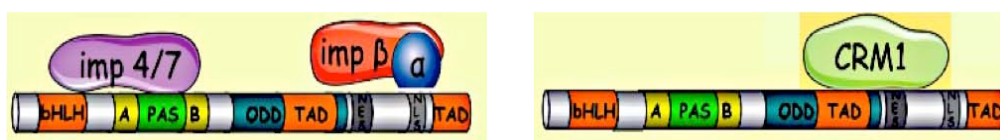


Εικόνα 1: Οι δομικές επικράτειες των μελών της οικογένειας των HIF. Οι παράγοντες HIF αποτελούνται από συντηρημένες περιοχές που εμπλέκονται στη σύνδεση τους με το DNA (έλικα-βρόχος-έλικα, bHLH), την αλληλεπίδραση μεταξύ α-υπομονάδας και ARNT (PAS-A και PAS-B), την οξυγόνο-εξαρτώμενη αποικοδόμηση τους (ODD) και τη μεταγραφική ενεργοποίηση (N-TAD, C-TAD) (29).

Στο μόριο του HIF-1α έχουν επιπλέον βρεθεί και χαρακτηριστεί δύο ειδών συντηρημένες αλληλουχίες, οι οποίες λειτουργούν ως σήματα που καθορίζουν τη μετακίνηση του προς και από τον πυρήνα. Η εκδήλωση της δράσης του HIF-1α ως μεταγραφικού παράγοντα εξαρτάται από τη συσσώρευσή του στον πυρήνα, μια διαδικασία που διαμεσολαβείται από το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Ο HIF-1α διαθέτει, βάσει αλληλουχίας, τρία βασικά «κλασσικά» NLS. Τα δύο από αυτά βρίσκονται στην αμινοτελική (αμινοξέα 17-74) και ένα στην καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 718-756). Ωστόσο, έχει δειχθεί πειραματικά ότι μόνο το καρβοξυτελικό βασικό NLS (αμινοξέα 716–757) είναι λειτουργικό και αναγνωρίζεται από μέλη της οικογένειας των ιμφορτινών α, τα οποία δεσμεύονται στον HIF-1α και τον εισάγουν

στον πυρήνα (18) (30, 31) (Εικόνα 2). Παρομοίως με τον HIF-1α, ο HIF-2α διαθέτει στην ίδια καρβοξυτελική επικράτεια (αμινοξέα 705-742) ένα συντηρημένο βασικό NLS (32). Παρόλα αυτά, στον HIF-1α η λειτουργία του συγκεκριμένου NLS δεν είναι ο μοναδικός μηχανισμός που ρυθμίζει την εισαγωγή του στον πυρήνα, καθώς, καταστροφή του καρβοξυτελικού NLS δεν απέκλεισε τον πυρηνικό εντοπισμό του HIF-1α (33). Περισσότερα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ενεργός μεταφορά του HIF-1α διαμέσω των πυρηνικών πόρων πραγματοποιείται από διαφορετικούς υποδοχείς ιμπορτινών, όπου εκτός από τα μέλη της οικογένειας των ιμπορτινών α, περιλαμβάνουν επίσης τις ιμπορτίνες 4 και 7 (33). Η πρόσδεση στις ιμπορτίνες 4 και 7 διαμεσολαβείται από το αμινοτελικό τμήμα του HIF-1α (αμινοξέα 1-251) (Εικόνα 2).

Ωστόσο, ο HIF-1α μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όταν τα ερεθίσματα που ευνοούν τον πυρηνικό του εντοπισμό και την ενίσχυση της δράσης του, παύουν να υπάρχουν. Η διεργασία εξαγωγής του από τον πυρήνα εξαρτάται από μια συντηρημένη υδρόφοβη αλληλουχία που λειτουργεί ως σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal, NES). Στον HIF-1α έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη ενός άτυπου NES στην καρβοξυτελική του επικράτεια (⁶³²MEDIKILI⁶³⁹), το οποίο αναγνωρίζεται από την κύρια εξπορτίνη των θηλαστικών CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1 protein), η οποία προσδένεται στον HIF-1α στο σημείο αυτό και τον εξάγει στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 2). Το συγκεκριμένο NES έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί το μόνο αποτελεσματικό τρόπο μεταφοράς του HIF-1α έξω από τον πυρήνα, καθώς η μετάλλαξή του οδήγησε σε παγίδευση του HIF-1α μέσα στον πυρήνα (34).



Εικόνα 2: Δομικές περιοχές και αλληλεπιδράσεις υπεύθυνες για τη μετακίνηση του HIF-1α προς και από τον πυρήνα. Η εισαγωγή του HIF-1α στον πυρήνα διαμεσολαβείται από μέλη της οικογένειας των ιμπορτινών, με την ιμπορτίνη α να αναγνωρίζει το καρβοξυτελικό NLS του HIF-1α και τις ιμπορτίνες 4/7 να αλληλεπιδρούν με το αμινοτελικό τμήμα του. Η εξπορτίνη CRM1 προσδένεται στο καρβοξυτελικό NES του HIF-1α και τον εξάγει στο κυτταρόπλασμα.

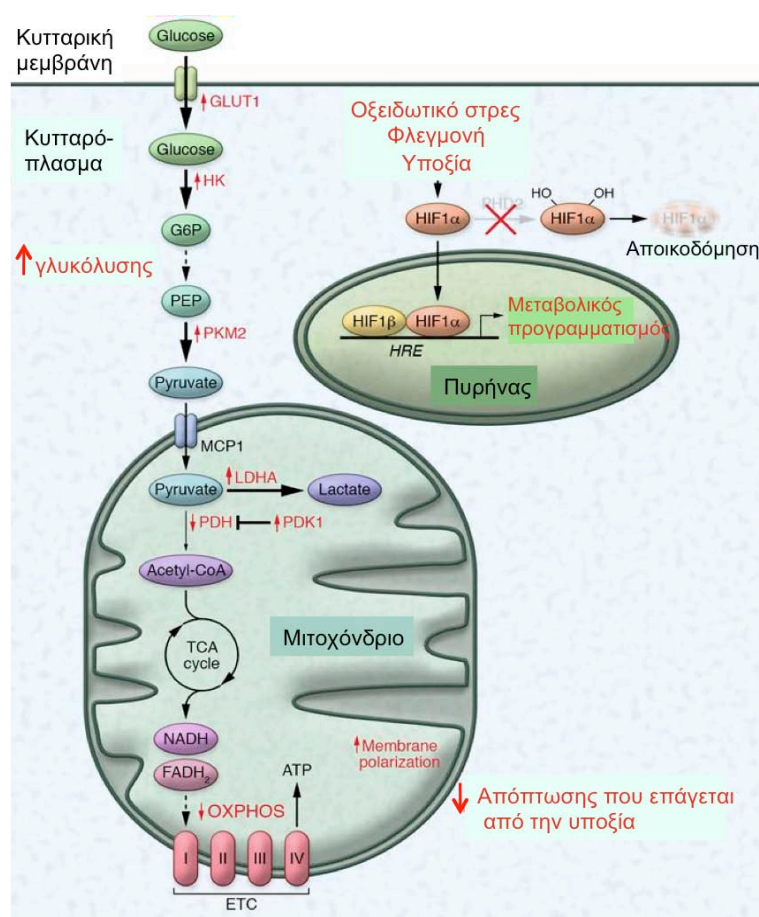
A.2.2 Ο φυσιολογικός ρόλος των HIF και η διαφορική ρύθμιση της μεταγραφής από τους HIF-1 και HIF-2

Οι HIF ρυθμίζουν σημαντικές φυσιολογικές διεργασίες, που είναι απαραίτητες για την προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας, καθώς επάγουν την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε ποικίλα βιολογικά μονοπάτια.

Παρόλο που οι δύο ισομορφές του HIF εμφανίζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, οι ρόλοι τους είναι αρκετά διακριτοί. Ο HIF-1α εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και σταθεροποιείται άμεσα μετά από την έκθεση των κυττάρων σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, ενώ η έκφραση του HIF-2α φαίνεται να είναι ιστό-ειδική. Σ υγκεκριμένα, τα πρωτεϊνικά του επίπεδα βρέθηκαν αυξημένα σε κύτταρα του ενδοθελίου, του ήπατος, του πνεύμονα, της καρδιάς, του εγκεφάλου, του επιθηλίου του παχέος εντέρου και σε μυϊκά κύτταρα (3), (10), ενώ, ενεργοποιείται μετά από έκθεση των κυττάρων σε μεγαλύτερης διάρκειας υποξία.

Κάποια γονίδια-στόχοι της υποξίας επάγονται και από τις δύο HIF ισομορφές, ωστόσο η καθεμιά ρυθμίζει ειδικά τη μεταγραφή ενός διαφορετικού σετ γονιδίων. Έτσι, ο HIF-1 επηρεάζει περισσότερο κυτταρικές λειτουργίες, εμπλεκόμενος κυρίως στον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού, καθώς επάγει την ενεργοποίηση των γλυκολυτικών ενζύμων και παραγόντων που επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Αντίθετα, ο HIF-2 επηρεάζει συστημικές λειτουργίες, καθώς σχετίζεται περισσότερο με την ερυθροποίηση, το μεταβολισμό του σιδήρου και την αγγειογένεση.

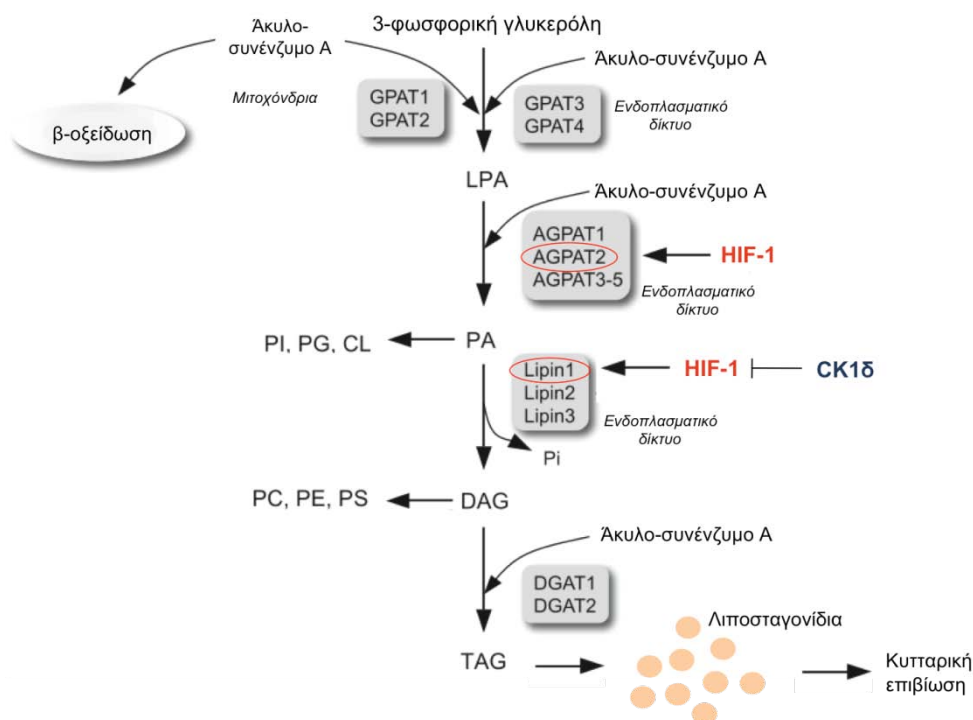
Ο HIF-1, ελέγχει το μεταβολισμό της γλυκόζης και είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση του φαινοτύπου Warburg σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Επάγει αμέσως μ αά την έκθεση των κυττάρων σε υποξία την έκφραση των μεταφορέων της γλυκόζης (GLUT1 και GLUT3) και σχεδόν όλων των γλυκολυτικών ενζύμων, όπως η εξοκινάση II (HKII) και η αφυδρογονάση του γαλακτικού (LDH), οδηγώντας το κύτταρο να χρησιμοποιεί κυρίως την αναερόβια γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας (35), (36). Επίσης, ο HIF-1 επηρεάζει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων με πολλούς τρόπους, ένας εκ των οποίων είναι η επαγωγή της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDK1). Το ένζυμο αυτό φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τη λειτουργία της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, η οποία αποτελεί το σημείο ζεύξης της γλυκόλυσης με τον κύκλο του Krebs και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια αλλά και της παραγωγής ROS, που σχηματίζονται κατά τη λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την υποξία (37). Η στροφή προς την αναερόβια γλυκόλυση διασφαλίζει την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού από τον HIF-1 και ο φαινότυπος Warburg. Μετά την έκθεση σε συνθήκες υποξίας, η σταθεροποίηση των HIF-α και η ρύθμιση της μεταγραφής προκαλούν τον αντισταθμιστικό επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού, ο οποίος περιλαμβάνει την αυξημένη έκφραση του μεταφορέα γλυκόζης 1 (GLUT1), της εξοκινάσης (HK), η οποία μετατρέπει τη γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P) και της αφυδρογονάσης του γαλακτικού (LDHA), η οποία μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε γαλακτικό οξύ. Ταυτόχρονα, υπάρχει αυξημένη δράση της κινάσης του πυροσταφυλικού (PKM2), η οποία επιβραδύνει την παραγωγή πυροσταφυλικού από το φωσφοενελοπυροσταφυλικό (PEP) και μειωμένη λειτουργία της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDH), η οποία οφείλεται στην επαγωγή της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDK1). Το φαινόμενο Warburg προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και η ταυτόχρονη υπερπόλωση του δυναμικού της μεμβράνης του μιτοχονδρίου προάγει την αποφυγή της εξαρτώμενης από τα μιτοχόνδρια απόπτωσης. ETC: αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (37), τροποποιημένη.

Πρόσφατα δεδομένα εμπλέκουν τον HIF-1 και στον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των λιπιδίων. Σε συνθήκες υποξίας, η μειωμένη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων και η αναστολή της β-οξειδωσης, οδηγούν σε αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Η υπέρμετρη συσσώρευση όμως των λιπαρών οξέων, μπορεί να οδηγήσει σε λιποτοξικότητα και κυτταρικό θάνατο. Έτσι, τα κύτταρα για να επιβιώσουν μετατρέπουν τα λιπαρά οξέα σε τριακυλογλυκερόλες, που συσσωρεύονται σε σταγονίδια

λίπους. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην εξαρτώμενη από τον HIF-1 επαγωγή των γονιδίων της ακυλοτρανσφεράσης της 1-ακυλο 3-φωσφορικής γλυκερόλης (AGPAT2) και της λιπίνης-1 (LPIN1) που εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριγλυκεριδίων, μια διαδικασία απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων στην υποξία (38) (Εικόνα 4).

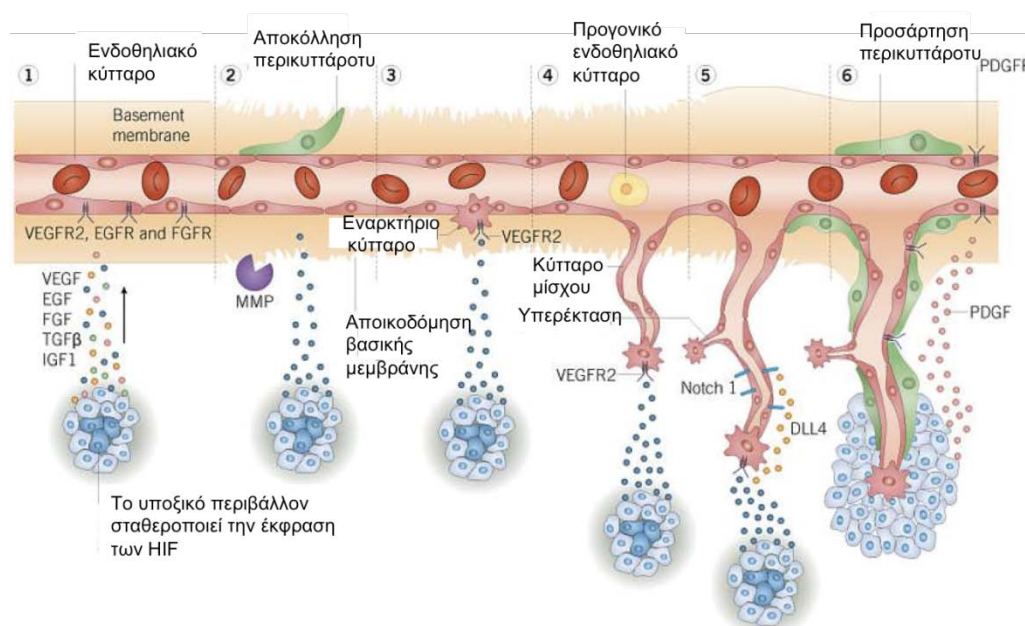


Εικόνα 4: Μονοπάτι βιοσύνθεσης της τριακυλογλυκερόλης (TAG) και των γλυκερό-φωσφολιπιδίων. GPAT: ακυλοτρανσφεράση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης, LPA: λυσοφωσφατιδικό οξύ, AGPAT: ακυλοτρανσφεράση της 3-φωσφορικής-1-ακυλογλυκερόλης, PI: φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, PG: φωσφατιδυλογλυκερόλη, CL: καρδιολιπίνη, PA: φωσφατιδικό οξύ, PC: φωσφατιδυλοχολίνη, PE: φωσφατιδυλαιθανολ-αμίνες, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, DAG: διακυλογλυκερόλη, DGAT: ακυλοτρανσφεράση της διακυλογλυκερόλης. Τα ένζυμα Lipin1 και AGPAT2 επάγονται από τον HIF-1 (38), τροποποιημένη.

Ένας άλλος σημαντικός φυσιολογικός ρόλος των HIF είναι η αγγειογένεση. Πρόκειται για τη διαδικασία σχηματισμού νέων τριχοειδών από τα προϋπάρχοντα αγγεία, με σκοπό την αύξηση της μεταφοράς οξυγόνου στα υποξικά κύτταρα. Οι HIF και κυρίως ο HIF-2, επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που διαμεσολαβούν στην αγγειογένεση, όπως είναι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, (vascular endothelial growth factor-VEGF, platelet-derived growth factor-PDGF, fibroblast growth factor-FGF), η ενδοθηλίνη (EDN1), η αγγειοποιητίνη 1 (ANGPT1), μεταλλοπρωτεάσες (matrix metalloproteinase-2, MMP2), παράγοντες που προωθούν τη διηθητικότητα (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) και παράγοντες που

διαμεσολαβούν στη μετανάστευση και διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων (octamer-binding transcription factor 4, OCT4), ώστε τελικά σχηματίζονται τα νέα αγγεία και αποκαθίσταται η παροχή οξυγόνου στις υποξικές περιοχές (39), (40-43) (Εικόνα 5).

Ο HIF-2α ρυθμίζει επίσης τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην ερυθροποίηση (erythropoietin, *EPO*), στην αντιοξειδωτική άμυνα (Superoxide dismutase 2, *SOD2*) και στον πολλαπλασιασμό (Transforming Growth Factor alpha *TGF-α*, *Cyclin D1*).



Εικόνα 5: Η διαδικασία της αγγειογένεσης. Η υποξική σταθεροποίηση των HIF, οδηγεί σε έκφραση και απελευθέρωση από τα υποξικά κύτταρα προ-αγγειογενετικών παραγόντων, που κατευθύνονται προς τα υπάρχοντα αγγεία. Επίσης, η ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών έχει σαν αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης του υπάρχοντος αγγείου. Η πρόσδεση των αυξητικών παραγόντων, με κυριότερο τον VEGF, σε υποδοχείς ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγείου, οδηγεί στη μετανάστευση ειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων προς την κατεύθυνση απελευθέρωσης των αγγειογενετικών παραγόντων. Ακολουθεί διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και πολλαπλασιασμός τους, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό του νέου αγγείου. Η αγγειογένεση ολοκληρώνεται με τη σταθεροποίηση και ωρίμανση του νέου αγγείου και την παροχή οξυγόνου στα υποξικά κύτταρα ([Cancer Research Product Guide](#), Edition 3, 2015, τροποποιημένη).

Η διαφορετική ικανότητα ρύθμισης της μεταγραφής από τους HIF, οφείλεται επίσης στο γεγονός ότι οι δύο ισομορφές συνεργάζονται και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για την επαγωγή των γονιδίων-στόχων τους, οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ των HIF-1 και HIF-2. Γειτονικά των HRE στους υποκινητές καλά χαρακτηρισμένων γονιδίων-στόχων των HIF, έχουν βρεθεί αλληλουχίες αναγνώρισης και δέσμευσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων (44). Ο παράγοντας STAT3 δρα συνεργατικά με τον HIF-1α για την προσέλκυση της

RNAPII και την επαγωγή γονιδίων-στόχων του HIF-1, όπως *VEGF* (vascular endothelial growth factor), *CAIX* (carbonic anhydrase IX), *PGK1* (Phosphoglycerate kinase 1) (40). Ο HIF-2α επίσης λειτουργεί σε συνεργασία με άλλους παράγοντες που δεσμεύονται στο DNA, όπως οι USF2 (Upstream Stimulatory factor 2), SP1 (Specificity Protein 1) και ELK (ETS Transcription Factor), οι οποίοι δρουν στον ίδιο ενισχυτή (45-49).

Διάφορες ομάδες τέλος υποστήριξαν ότι η περιοχή N-TAD ευθύνεται για την επιλεκτικότητα των γονιδίων, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση στους HIF-α διαφορετικών συνενεργοποιητών της μεταγραφής (p300/CBP, SWI/SNF) και συμπλόκων απαραίτητων για την ακετυλίωση των ιστονών και την αναδίπλωση της χρωματίνης (43), (50). Η κατάσταση της χρωματίνης, η δράση της RNAPII (RNA Polymerase II), η διαθεσιμότητα των διαφόρων συμπαραγόντων της μεταγραφής, μπορεί να ευθύνονται και για την επιλεκτική επαγωγή γονιδίων ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (51), (40), (52).

A.3 Η ρύθμιση των HIF-α

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η σύνθεση των HIF-α υπομονάδων είναι συνεχής, αλλά η ενεργοποίηση της δράσης τους είτε σε φυσιολογικές, είτε σε υποξικές συνθήκες ρυθμίζεται σε πολλά στάδια, όπως σε επίπεδο μεταγραφής, σε επίπεδο έκφρασης, μέσω ελέγχου της σταθερότητάς του, της εισαγωγής του στον πυρήνα, του ετεροδιμερισμού τους με τον ARNT, της πρόσδεσης στο DNA και της αλληλεπίδρασης με άλλους συμπαραγόντες της μεταγραφής. Είναι λοιπόν εμφανές, ότι η ρύθμιση των HIF-α είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία μηχανισμών, οι οποίοι μπορεί να εξαρτώνται από την παρουσία του οξυγόνου ή να λειτουργούν ανεξάρτητα από αυτό.

A.3.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση των HIF-α

Ο πιο διαδεδομένος και καλά χαρακτηρισμένος τρόπος ρύθμισης των HIF-α είναι αυτός που εξαρτάται από το οξυγόνο. Οι μηχανισμοί ρύθμισης που ελέγχονται από τη συγκέντρωση του οξυγόνου είναι κοινοί για τους HIF-1α και HIF-2α. Κατά τη νορμοξία η α-υπομονάδα των HIF παράγεται συνεχώς, αλλά δεν είναι ανιχνεύσιμη καθώς αποικοδομείται ταχύτατα.

Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, τα μέλη μιας οικογένειας πρόλυλο-υδροξυλασών PHD (Prolyl Hydroxylase Domain) που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα το μοριακό οξυγόνο, καθώς και το α-κετογλουταρικό οξύ, το ασκορβικό οξύ και το σίδηρο ως συμπαραγόντες, αναγνωρίζουν το γενικό μοτίβο LXXLAP και υδροξυλιώνουν την α-υπομονάδα των HIF σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης (Pro-402 και Pro-564 για τον HIF-1α και Pro-405 και Pro-531 για τον HIF-2α) που εντοπίζονται στην επικράτεια ODD των HIF-α (53, 54). Η

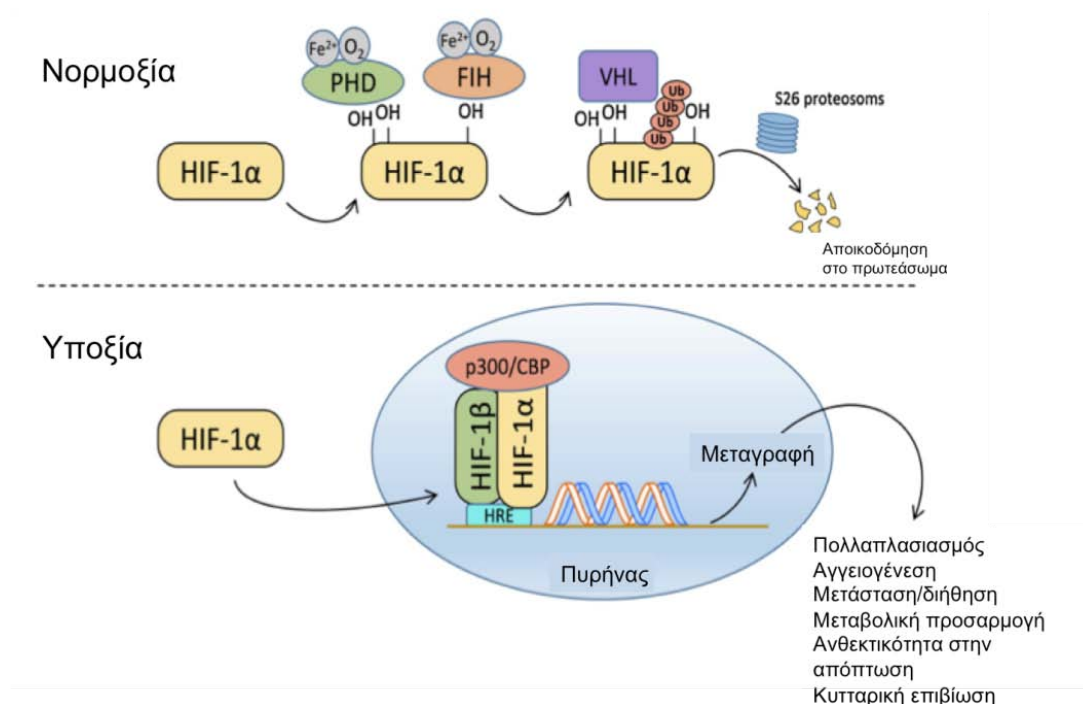
προστιθέμενη υδροξυλομάδα αναγνωρίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη VHL (von Hippel-Lindau), η οποία αποτελεί μέρος του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Η σύνδεση του VHL στους HIF-α έχει σαν αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση τους και τη σηματοδότηση της μεταφοράς των HIF-α στο 26S πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (55), (56). Όταν το περιβάλλον γίνει υποξικό, οι PDH απενεργοποιούνται λόγω της χαμηλής διαθεσιμότητας του οξυγόνου, κι έτσι οι HIF-α σταθεροποιούνται και εισάγονται στον πυρήνα μέσω του σήματος πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS). Εκεί διμερίζονται με τον ARNT και επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων της υποξίας (Εικόνα 6).

Είναι άξιο αναφοράς ότι οι ισομορφές PDH 2 και PDH 3 αποτελούν γονίδια-στόχους των HIF, διαμορφώνοντας έτσι, ένα κύκλο αρνητικής ανατροφοδότησης της ρύθμισης των HIF (4).

Οι HIF-1α και HIF-2α υπόκεινται και σε έναν ακόμη οξυγόνο-εξαρτώμενο μηχανισμό ρύθμισης της δράσης τους μέσω υδροξυλίωσης. Το ένζυμο FIH (Factor Inhibiting HIF, παράγοντας που αναστέλλει τον HIF) τροποποιεί τους HIF-α σε ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn803 για τον HIF-1α και Asn847 για τον HIF-2α) το οποίο βρίσκεται μέσα στην περιοχή C-TAD. Η υδροξυλίωση αυτή παρεμποδίζει τη σύνδεση των συμπαραγόντων της μεταγραφής p300/CBP στην περιοχή C-TAD των HIF-α, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η μεταγραφική ενεργοποίηση των HIF (Εικόνα 6). Η αλληλεπίδραση των p300/CBP με την περιοχή C-TAD των HIF-α, περιλαμβάνει μια αλλαγή της τρισδιάστατης διαμόρφωσης, η οποία κρύβει πολύ καλά την ασπαραγίνη-στόχο του FIH στο εσωτερικό της. Συνεπώς, η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης μπλοκάρει τη μεταβολή αυτή (57), (58).

Ο FIH έχει μικρότερη σταθερά συγγένειας με το οξυγόνο (K_m) σε σχέση με τις PHD. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να εκδηλώνει τη δράση του ακόμη και σε χαμηλότερη συγκέντρωση οξυγόνου, έτσι ώστε οι HIF-α που σταθεροποιούνται μετά την απενεργοποίηση των PHD, υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση από τον FIH (59). Ενδιαφέρον είναι ότι ο FIH εμφανίζεται να υδροξυλιώνει πιο ειδικά τον HIF-1α παρά τον HIF-2α (60).

Έτσι, η υδροξυλίωση αποτελεί έναν διπλό μηχανισμό ελέγχου της ρύθμισης της δράσης των HIF-α όταν τα επίπεδα του οξυγόνου είναι φυσιολογικά. Η α-υπομονάδα που συντίθεται αποικοδομείται άμεσα στο πρωτεάσωμα μέσω της δράσης των PHD. Τα μόρια των HIF-α που διαφεύγουν αυτού του μηχανισμού καθίστανται μεταγραφικά ανενεργά λόγω της δράσης του FIH, ακόμη και όταν τα επίπεδα του οξυγόνου μειωθούν και απενεργοποιούνται οι PDH (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α μέσω υδροξυλίωσης. Ρύθμιση της σταθερότητας και της μεταγραφικής ενεργοποίησης του HIF-1α μέσω υδροξυλίωσης από τις PHD και από τον FIH αντίστοιχα σε συνθήκες νορμοξίας. Οι PHD ενεργοποιούνται από το οξυγόνο και υδροξυλιώνουν κατάλοιπα προλίνης του HIF-1α επιτρέποντας την πρόσδεση του VHL, ο οποίος μαζί με τους παράγοντες Cullin2, elongin C και Ring Box1 συνιστούν το σύμπλοκο της λιγάσης της ουβικιτίνης E3, με αποτέλεσμα την πολυ-ουβικιτινίωση του HIF-1α και την αποικοδόμησή του στο 26S πρωτεάσωμα. Ο FIH υδροξυλιώνει τον HIF-1α και παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του με τους συμπαραγόντες της μεταγραφής p300/CBP, αναστέλλοντας έτσι τη μεταγραφική του ενεργότητα (61), τροποποιημένη.

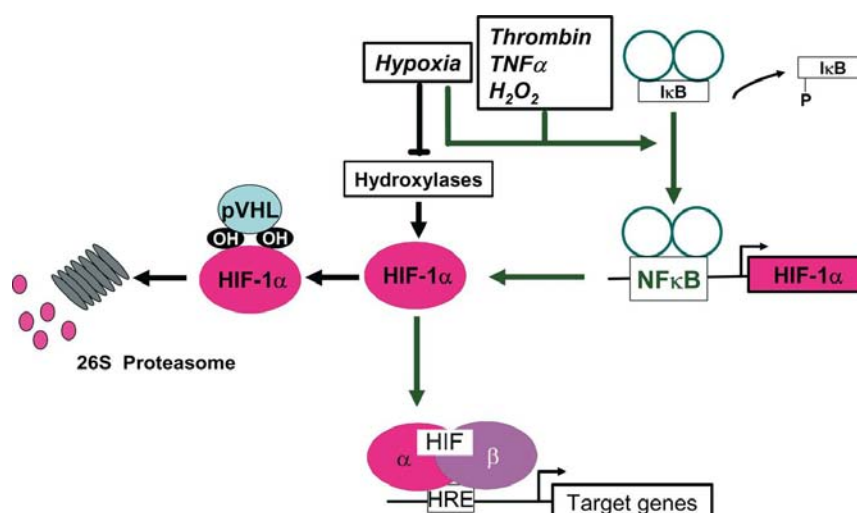
A.3.2 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση των HIF-α

Εκτός από τα επίπεδα του οξυγόνου, η ενεργοποίηση των HIF-α ρυθμίζεται κι από ανεξάρτητους του οξυγόνου μηχανισμούς, οι οποίοι λειτουργούν ως απόκριση σε ερεθίσματα όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, η παρουσία παραγόντων ανάπτυξης και κυτοκινών καθώς και από παράγοντες που επηρεάζουν το κυτταρικό περιβάλλον, όπως είναι το pH. Έτσι, υπάρχουν πολλά και διαφορετικά επίπεδα ελέγχου της δράσης των HIF-α, που περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της μεταγραφής και μετάφρασής τους, καθώς και πλήθος μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων (62), (63). Οι ανεξάρτητοι από το οξυγόνο μηχανισμοί που ρυθμίζουν τους HIF-1α και HIF-2α είναι διακριτοί. Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται κυρίως στη μελέτη της ρύθμισης του HIF-1α μέσω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

A.3.2.1 Ρύθμιση του HIF-1α από σηματοδοτικά μονοπάτια

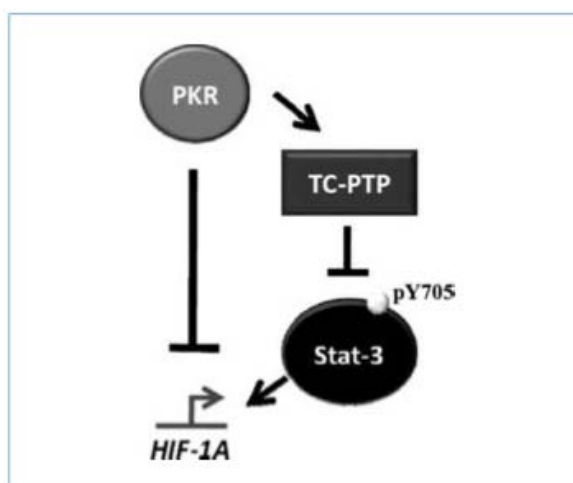
A.3.2.1.1 Ρύθμιση της μεταγραφής του HIF-1α

Υπάρχουν αναφορές οι οποίες εμπλέκουν το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου του *HIF-1A*, μετά από ενεργοποίηση του μονοπατιού σε απόκριση στον TNF-α (Tumor Necrosis Factor α), την κολχικίνη και τον αυξητικό παράγοντα HGF (Hepatocyte Growth Factor) (64). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η μεταγραφή του *HIF-1A* επάγεται και ως απόκριση σε καταστάσεις φλεγμονής και σε κυτταροκίνες, όπως η ιντερφερόνη γ που εκκρίνεται από τα βοηθητικά (Th1) κύτταρα (65). Η επαγωγή του *HIF-1A* εμπλέκει κυρίως το κανονικό μονοπάτι του NF-κΒ (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells) στο οποίο, ο παράγοντας IκΒ (Inhibitory κΒ) φωσφορυλιώνεται και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα, με αποτέλεσμα ο παράγοντας NF-κΒ να απελευθερώνεται, να εισέρχεται στον πυρήνα και να επάγει την αύξηση των επιπέδων mRNA του *HIF-1A*. Παρουσία θρομβίνης, H₂O₂ (66) και βραχείας διάρκειας υποξίας (67), οι υπομονάδες του NF-κΒ, p50 και p65, προσδένονται άμεσα στον υποκινητή του γονιδίου του HIF-1α, στην περιοχή -197/-188 ζευγών βάσεων, σε μια συντηρημένη μεταξύ των οργανισμών αλληλουχία (68) (Εικόνα 7). Επίσης, αν και με διαφορετικούς μηχανισμούς, και ο HIF-2α έχει βρεθεί να ενεργοποιείται μεταγραφικά από το μονοπάτι του NF-κΒ, το οποίο επάγεται από κυτταροκίνες των Th2 βοηθητικών κυττάρων όπως η ιντερλευκίνη 4 (65) ή από την ενεργοποίηση της μη-κανονικής οδού του NF-κΒ από την πρωτεΐνη LIGHT (tumor necrosis factor superfamily member 14, TNFSF14) (69).



Εικόνα 7: Ρύθμιση της μεταγραφής του HIF-1α από το μονοπάτι του NF-κΒ. Η επαγωγή του μονοπατιού του NF-κΒ από ογκογονίδια, υποξία και φλεγμονώδεις παράγοντες οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου του HIF-1α (64).

Ένας άλλος τρόπος μεταγραφικής ρύθμισης του *HIF-1A* είναι από το μεταγραφικό παράγοντα STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3). Ο παράγοντας αυτός ενεργοποιείται από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, όπως η IL-6 (ιντερλευκίνη 6) και ο EGF (epidermal growth factor), φωσφορυλιώνεται σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης (Y705) από κινάσες της οικογένειας JAK, διμερίζεται και εισάγεται στον πυρήνα όπου ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων (70). Έχει δειχθεί ότι ο STAT3 επάγεται στην υποξία και προσδένεται σε στοιχεία του υποκινητή του *HIF-1A*, ενεργοποιώντας έτσι, μεταγραφικά τον HIF-1α σε καρκινικά και μυελοειδή κύτταρα (71). Αρνητική ρύθμιση της συγκεκριμένης οδού πραγματοποιείται από την κινάση του eIF2α (eukaryotic translation initiation factor 2α), PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase), η οποία καταστέλλει τη μεταγραφή του HIF-1α. Η αναστολή της μεταγραφής του *HIF-1A* από την PKR είναι ανεξάρτητη από τη φωσφορυλίωση του eIF2α, αλλά οφείλεται στην αποφωσφορυλίωση του STAT3 από την φωσφατάση TC-PTP (T-cell Protein Tyrosine Phosphatase) που ενεργοποιείται από την PKR. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της συσσώρευσης του HIF-1α και της επαγωγής των γονιδίων-στόχων του (72) (Εικόνα 8).



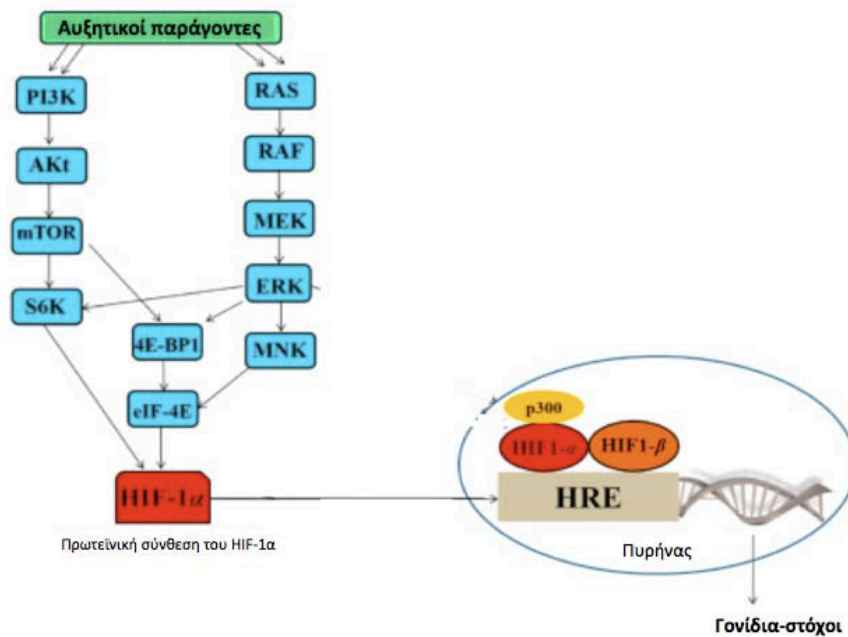
Εικόνα 8: Ρύθμιση του HIF-1α από την PKR σε επίπεδο μεταγραφής. Η PKR αναστέλλει τη μεταγραφή του HIF-1α σε νορμοξικά κύτταρα, αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση του STAT3 στο κατάλοιπο Y705, μέσω της ενεργοποίησης της φωσφατάσης τυροσίνης TC-PTP. Η απενεργοποίηση του STAT3 είναι αναγκαία και επαρκής για την αναστολή της μεταγραφής του HIF-1α (72).

A.3.2.1.2 Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α

Διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια ρυθμίζουν τον HIF-1α και σε επίπεδο μετάφρασης του mRNA του. Έτσι, εκτός από την έλλειψη οξυγόνου, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α αυξάνονται και ως απόκριση σε ερεθίσματα που προέρχονται από διάφορους αυξητικούς

παράγοντες, οι οποίοι επάγουν την έκφραση του HIF-1α με ιστοειδικό τρόπο, σε αντίθεση με την καθολική επαγωγή του από την υποξία. Επιπλέον, ενώ η υποξία σχετίζεται με μειωμένη αποικοδόμηση του HIF-1α, οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτταροκίνες και άλλα σηματοδοτικά μόρια, διεγείρουν τη σύνθεση του HIF-1α μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK) (73).

Συγκεκριμένα, η σύνδεση σηματοδοτικών μορίων κυρίως σε υποδοχείς που έχουν δράση κινάσης τυροσίνης οδηγεί σε ενεργοποίηση των PI3K/AKT και MAPK μονοπατιών. Ακολουθεί ένας καταρράκτης φωσφορυλιώσεων και ενεργοποίησης κινασών πρωτεϊνών, με την PI3K να ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT (γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B, PKB) και την πρωτεΐνη mTOR (mammalian Target of Rapamycin), και τις MEK να ενεργοποιούν τις ERK1/2 και αυτές την MNK (MAPK interacting Kinase). Οι ERK1/2 και mTOR ενεργοποιούν την p70 S6 κινάση (S6K), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη. Παράλληλα, φωσφορυλιώνονται από συστατικές κινάσες των παραπάνω μονοπατιών ο ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF-4E) και η προσδεδεμένη σε αυτόν πρωτεΐνη 4E-BP1 (4E Binding Protein 1) (74). Το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης του 4E-BP1 είναι η παρεμπόδιση της σύνδεσης του στον eIF-4E, γεγονός που οδηγεί στη μετάφραση των mRNA με 5' κάλυμμα. Επίσης η εξαρτώμενη από την MNK φωσφορυλίωση του eIF-4E, διεγείρει τη δράση του απευθείας. Έτσι, μέσω της λειτουργία των μονοπατιών αυτών αυξάνεται η μετάφραση μιας ομάδας συγκεκριμένων mRNA στα οποία συμπεριλαμβάνεται και αυτό του HIF-1α, με αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων (73, 75) (Εικόνα 9).

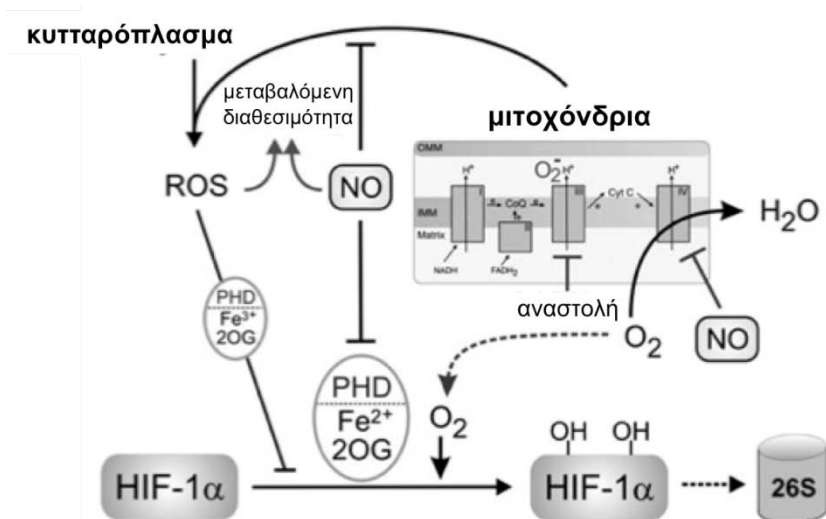


Εικόνα 9: Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α από αυξητικούς παράγοντες. Η σηματοδότηση από αυξητικούς παράγοντες οδηγεί στην ενεργοποίηση των μονοπατιών της PI3K και των MAPK και την επακόλουθη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF-4E, ο οποίος διεγείρει την έκφραση του HIF-1α (74), τροποποιημένη.

A.3.2.1.3 Ρύθμιση του HIF-1α από δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), μεταβολίτες και μη κωδικεύοντα μόρια RNA

Υπάρχουν, όμως, μηχανισμοί που ρυθμίζουν εκτός από τη σύνθεση και τη σταθερότητα του HIF-1α, ανεξάρτητα από το οξυγόνο. Έχειδειχθεί, ότι ο HIF-1α ρυθμίζεται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Στα κύτταρα των θηλαστικών, οι ROS δημιουργούνται φυσιολογικά ως παραπροϊόντα του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, του κυτοχρώματος P450, των οξειδασών NADH/NADPH και των κυκλοξυγενασών. Το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), η ρίζα υδροξυλίου (HO^{\bullet}) και η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO^{\bullet}) είναι από τις συνηθέστερες μορφές των ROS. Τα κύτταρα αμύνονται στην παραγωγή ROS με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η καταλάση (CAT) (76). Όταν η παραγωγή των ROS υπερβεί την ικανότητα του κυττάρου να ανταπεξέλθει στο οξειδωτικό φορτίο, προκαλείται οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλεί βλάβες στο DNA και απορρύθμιση του πολλαπλασιασμού ή απόπτωση. Εναλλακτικά, οι ROS δρουν ως σήματα για την ενεργοποίηση συγκεκριμένων μονοπατιών, με αποτέλεσμα την αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης, την παύση του κυτταρικού κύκλου ή την επιβίωση (77). Έχειδειχθεί, ότι η αύξηση

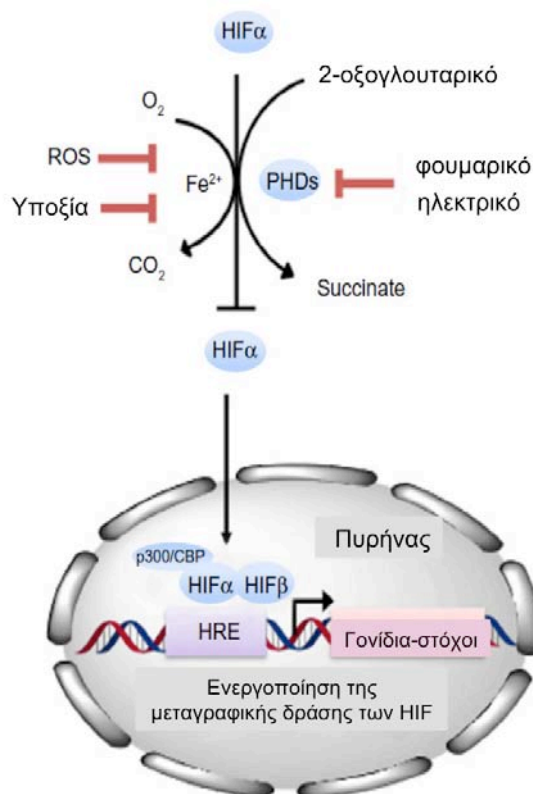
των παραγόμενων ROS από τα μιτοχόνδρια, είτε σε κανονική συγκέντρωση οξυγόνου είτε στην υποξία, οδηγεί στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α λόγω οξείδωσης του διαθέσιμου Fe^{2+} , αναστέλλοντας έτσι τις PHDs. Επιπλέον, τα επίπεδα του $\text{NO}\bullet$ εκτός από το να μειώνουν τη δράση των PHD μέσω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων (S-νιτροσυλίωση), σταθεροποιούν τα επίπεδα του HIF-1α (Εικόνα 10) (78).



Εικόνα 10: Ρύθμιση του HIF-1α από τα ROS και NO. Οι PHD που καταλύουν την υδροξυλίωση και αποικοδόμηση του HIF-1α ελέγχονται από τα ROS και NO. Τα ROS προέρχονται από τα μιτοχόνδρια ή από κυτταροπλασματικές πηγές και οδηγούν σε σταθεροποίηση του HIF-1α (78), τροποποιημένη.

Σημαντική, επίσης, είναι η συμβολή διαφόρων μεταβολιτών στη σταθεροποίηση και αύξηση της δράσης του HIF-1α. Για παράδειγμα, το φουμαρικό και το ηλεκτρικό οξύ μειώνουν την ενζυμική δραστηριότητα των PHD μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης, καθώς δεσμεύονται στις PHD και τις αναστέλλουν (79), (80), (81) (Εικόνα 11).

Επιπλέον, η συσσώρευση γαλακτικού και πυροσταφυλικού οξέος έχουν ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α (82). Από την άλλη, η διαθεσιμότητα κάποιων άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως η γλυκόζη, έχειδειχθεί ότι ρυθμίζει τη σταθερότητα του HIF-1α ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Σε φυσιολογικά κύτταρα, τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης προκαλούν την αύξηση της σταθεροποίησης του HIF-1α (83), ενώ σε καρκινικά κύτταρα ο HIF-1α σταθεροποιείται όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι υψηλά (84).



Εικόνα 11: Ρύθμιση της σταθεροποίησης του HIF-1α από προϊόντα του μεταβολισμού. Η υποξία, η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και η παρουσία κάποιων μεταβολιτών, οδηγούν σε αναστολή της δράσης των PHD, σταθεροποίηση του HIF-1α και επαγωγή της μεταγραφικής του ενεργότητας με μηχανισμούς εξαρτώμενους ή ανεξάρτητους από το οξυγόνο (85), τροποποιημένη.

Άλλα μόρια που ρυθμίζουν τον HIF-1α είναι τα μη κωδικά μόρια RNA. Η υποξία ρυθμίζει μεταγραφικά την έκφραση διαφόρων μικρών μορίων miRNA (MicroRNA, miR-23, -24, -26, -27, -103, -107, -181, -210, -213), είτε άμεσα μέσω των HIF ή έμμεσα από άλλους παράγοντες που ρυθμίζονται από την υποξία, όπως ο Oct-4. Υπάρχουν miRNA που ρυθμίζουν την έκφραση του HIF-1α, μέσω της δέσμευσης στο mRNA του είτε τη σταθερότητα του, ελέγχοντας την έκφραση πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τους HIF-α, όπως ο pVHL ή οι PHD (22). Για παράδειγμα, το miR-210 ρυθμίζει αρνητικά τη λειτουργία του SDHD (Succinate Dehydrogenase Complex Subunit D) με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του ηλεκτρικού που αναστέλλει τις PHD, ενώ, μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GPD1L (glycerol-e-phosphatase dehydrogenase 1-like) που με κάποιον άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό οδηγεί στη σταθεροποίηση του HIF-1α (86), (87).

Επίσης, διάφορα μεγάλου μεγέθους μη κωδικά μόρια RNA (long non-coding RNA) ρυθμίζουν με διάφορους τρόπους τον HIF-1α. Υπάρχουν lncRNA, όπως το «3'aHIF-1α», που προκαλούν μεταβολές στο γονιδίωμα ή αστάθεια στο mRNA του HIF-1α και αναστέλλουν την έκφραση του. Άλλα lncRNA (ENST00000480739 και pvt1) ρυθμίζουν την έκφραση

πρωτεϊνών όπως η OS-9, η οποία συμβάλλει στην αλληλεπίδραση του HIF-1α με τις PHD2/3, αυξάνοντας το ρυθμό αποικοδόμησης του. Τέλος υπάρχουν και περιπτώσεις lncRNA, όπως τα UCA1, CASC9, LINK-A και LncHIFCAR, τα οποία αυξάνουν τη δράση του HIF-1α είτε λόγω σταθεροποίησης του, είτε επάγοντας την αλληλεπίδραση του με πρωτεΐνες όπως οι CBP/p300 (22).

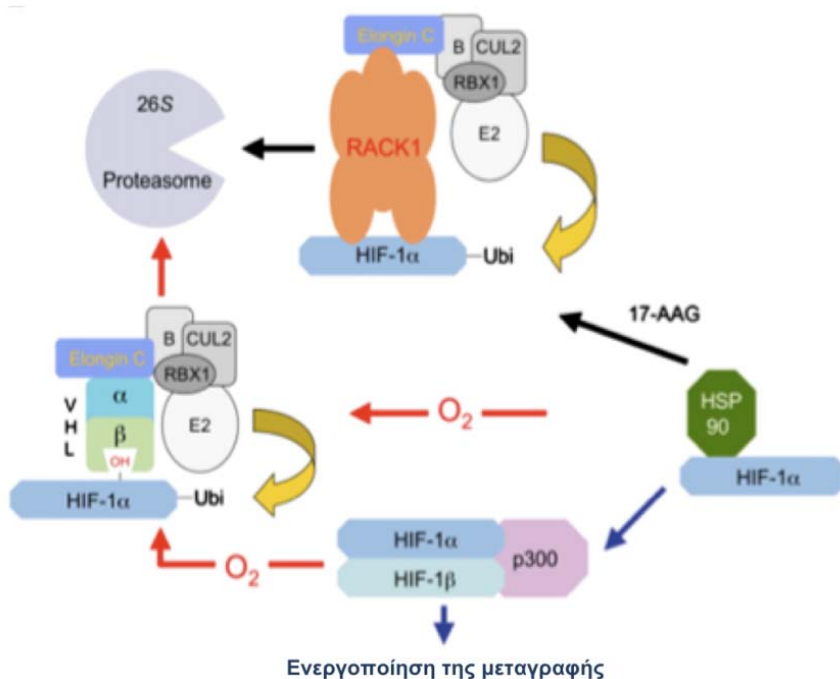
A.3.2.2 Ρύθμιση του HIF-1α μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες

Μετά-μεταφραστικά ο HIF-1α μπορεί να ρυθμίζεται είτε μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια και παράγοντες, είτε μέσω της τροποποίησής του από έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών ενζύμων (88, 89).

Έχει δειχθεί, ότι η αλληλεπίδραση του HIF-1α με τις πρωτεΐνες Hsp90 και RACK1 (Receptor of activated protein C kinase) ρυθμίζει τη σταθερότητά του ανεξάρτητα από το οξυγόνο. Η Hsp90 (πρωτεΐνη θερμικού σοκ και μοριακή συνοδός), βρέθηκε ότι συνδέεται *in vitro* με την περιοχή PAS του HIF-1α, τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και κατά την υποξία (90), με αποτέλεσμα την επαγωγή της δράσης του HIF-1. Αναστολή της Hsp90 με ουσίες όπως η γελδαναμυκίνη, προκάλεσε τη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον, αναστολή της αλληλεπίδρασης Hsp90-HIF-1α προώθησε την αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα, με έναν εξαρτώμενο από τον pVHL μηχανισμό (91) (Εικόνα 12).

Αντίθετα, η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης RACK1 με τον HIF-1α βρέθηκε ότι οδηγεί τον HIF-1α σε αποικοδόμηση, ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου και από την παρουσία του pVHL και των PHD. Η RACK1 ανταγωνίζεται την Hsp90 για την πρόσδεση στην περιοχή PAS-A του HIF-1α, καθώς, μετά από επώαση με τον αναστολέα της Hsp90 γελδαναμυκίνη ή την ανάλογη ένωση 17-AAG, παρατηρήθηκε η αλληλεπίδραση της RACK1 με τον HIF-1α, η οποία προώθησε την ουβικιτινίωση και αποικοδόμησή του (91). Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει, εκτός από την πρόσδεση της RACK1 στον HIF-1α, την προσέλκυση της Elogin-C, η οποία συνδέεται στην περιοχή WD6 της RACK1. Η Elogin-C στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την Elogin-B και με άλλα μέλη του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, με αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση του HIF-1α και την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα. Έτσι, η ισορροπία δέσμησης των RACK1 και Hsp90 στον HIF-1α ρυθμίζει την αποσταθεροποίηση ή σταθερότητα, αντίστοιχα, του τελευταίου, με ένα μηχανισμό που προσομοιάζει με αυτόν που εξαρτάται από τον pVHL, με τη μόνη διαφορά ότι δεν απαιτεί την ύπαρξη οξυγόνου (Εικόνα 12).

Το μηχανισμό αυτό συμπληρώνει η δράση των πρωτεϊνών Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase-1 (SSAT1) και Septin 9 (SEPT9_v1), οι οποίες είτε προωθούν είτε αναστέλλουν, αντίστοιχα, την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τη RACK1 και ρυθμίζουν τη σταθεροποίηση του (92), (93).



Εικόνα 12: Ρύθμιση της σταθερότητας του HIF-1α από τις πρωτεΐνες Hsp90 και RACK1. Μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α από τη RACK1 και την Hsp90. Η σύνδεση της Hsp90 στον HIF-1α οδηγεί σε σταθεροποίηση και επαγωγή της δράσης του. Αναστολή της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την Hsp90 και δέσμευση της RACK1 στην PAS-A περιοχή του HIF-1α, οδηγεί στην προσάρτηση του συμπλόκου Eloin-C/Eloin-B στον HIF-1α, με αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση και την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα ανεξάρτητα από το οξυγόνο (91), τροποποιημένη.

Μια άλλη αλληλεπίδραση του HIF-1α, αυτή με την MgcRacGap (Male germ cell Rac GTPase activator protein), δείχθηκε ότι επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 (94). Η MgcRacGap είναι μια πρωτεΐνη που ελέγχει τη δράση των μικρών Rho GTPασών, οι οποίες συμμετέχουν ενεργά στην ρύθμιση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού. Η αλληλεπίδραση αυτή, δεν επηρεάζει τη σταθερότητα ή τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α. Η MgcRacGap συνδέεται με την περιοχή PAS-B (αμινοξέα 244-352) του HIF-1α και παρεμποδίζει τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT και το σχηματισμό ενεργού συμπλόκου, με αποτέλεσμα τη μείωση της δράσης του HIF-1 (95).

Άμεση επίδραση στη δράση του HIF-1 έχει η αλληλεπίδραση της α-υπομονάδας του με συνενεργοποιητές της μεταγραφής, οι οποίοι προάγουν τη μεταγραφική του ενεργότητα. Οι

γνωστότεροι συμπαράγοντες της μεταγραφής που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α είναι οι p300/CBP, οι οποίοι δεσμεύονται μέσω της CH1 περιοχής τους στην επικράτεια TAD-C του HIF-1α και συνεισφέρουν στη μεταγραφική ενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων-στόχων του HIF-1. Οι p300/CBP είναι απαραίτητοι, κυρίως λόγω της ικανότητάς τους να τροποποιούν το τοπικό περιβάλλον της χρωματίνης, μέσω της δράσης ακετυλοτρανσφεράσης λυσίνης που διαθέτουν και επιπλέον λόγω της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με πυρηνικές πρωτεΐνες του μηχανισμού μεταγραφής. Άλλοι συμπαράγοντες της μεταγραφής με δράση ακετυλοτρανσφεράσης λυσίνης που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α είναι οι NCOA1, NCOA2, NCOA3 (Nuclear Receptor Co-activators), οι οποίοι συμμετέχουν στη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων (4). Επίσης, ο Luo και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η M2 ισομορφή της κινάσης του πυροσταφυλικού (PKM2) που επάγεται από τους HIF, αλληλεπιδρά μαζί τους σε ρόλο συνενεργοποιητή της μεταγραφής, συνεισφέροντας στη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στη στροφή του μεταβολισμού από τη οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση (*GLUT1*, *PDK1*, *LDHA*), ενισχύοντας το φαινόμενο Warburg σε καρκινικά κύτταρα (96, 97). Ακόμη, η κινάση CDK8 (Cyclin-dependent kinase 8) αποτελεί συμπαράγοντα του HIF-1α για τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων της υποξίας και παίζει σημαντικό ρόλο στην προσέλευση του SEC (Super Elongation Complex) και στην ενεργοποίηση της RNAPII (51). Στους παράγοντες του μηχανισμού της μεταγραφής οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α, συμπεριλαμβάνεται επίσης η πρωτεΐνη Pontin (παράγοντας αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης) που, πρόσφατα, δείχθηκε ότι ενισχύει την ενεργοποίηση ενός υποσυνόλου των γονιδίων-στόχων του HIF-1 (98). Τέλος, οι υπομονάδες BRM και BRG1 του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων SWI/SNF, το οποίο επάγει άμεσα τη μεταγραφή του HIF-1α, έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν και στη μεταγραφή μιας ομάδας γονιδίων-στόχων του HIF-1 ως συνενεργοποιητής (99), (100).

Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι ο HIF-1α αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν αρνητικά τη δράση του και λειτουργούν ως καταστολείς της εξαρτώμενης από τον HIF-1 μεταγραφής. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι η SIRT6 (Σιρτουΐνη 6), η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με τον HIF-1α και δεσμεύεται στους εκκινητές των γονιδίων-στόχων που κωδικοποιούν ένζυμα της γλυκόλυσης. Η SIRT6 αποτελεί καταστολέα της μεταγραφής μέσω της δράσης της ως απακετυλάση της ιστόνης H3K9 (101). Ένας άλλος καταστολέας της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α είναι ο παράγοντας CITED2 (Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2), ο οποίος αλληλεπιδρώντας με τις περιοχές CH1 και CH3 των p300/CBP παρεμποδίζει τη σύνδεσή τους με τις περιοχές N-TAD και C-

TAD του HIF-1α (102). Ο CITED2 αποτελεί ο ίδιος γονίδιο-στόχο του HIF-1 και δημιουργεί έναν μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης της δράσης του HIF-1.

Τέλος, πρόσφατα δείχθηκε η αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον TRAF6 (παράγοντας που σχετίζεται με τον TNFR), μια πρωτεΐνη που συντελεί στην ενεργοποίηση του NF-κΒ και παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της ανοσιακής απάντησης. Ο TRAF6 επάγει την έκφραση του HIF-1α ανεξάρτητα από το οξυγόνο, καθώς αυξάνει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα χωρίς να επηρεάζει ιδιαίτερα τα επίπεδα mRNA του (103). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται αυτό περιλαμβάνει τη δέσμευση του TRAF6 στον HIF-1α και την επακόλουθη πολυ-ουβικτινιλίωση του στη λυσίνη 63, που οφείλεται στη δράση E3 λιγάσης που διαθέτει ο TRAF6. Οι αλυσίδες πολυ-ουβικτινίνης που προστίθενται στον HIF-1α δε σηματοδοτούν την αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα, σε αντίθεση με την ουβικτινιλίωση που διαμεσολαβείται από τον VHL.

A.3.2.3 Ρύθμιση του HIF-1α μέσω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων

ο Ακετυλίωση:

Το πρότυπο ακετυλίωσης φαίνεται να συνεισφέρει στην ενεργοποίηση του HIF-1α τόσο θετικά όσο και αρνητικά (Εικόνα 13). Ο HIF-1α βρέθηκε ότι ακετυλιώνεται στη λυσίνη 532 (L532) που εντοπίζεται στην περιοχή ODD από την ακετυλοτρανσφεράση ARD1 (arrest-defective-1). Η ακετυλίωση αυτή ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον VHL και οδηγεί σε αποσταθεροποίησή του. Μετάλλαξη της λυσίνης 532 σε αργινίνη είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη σταθερότητα του HIF-1α (104). Παρατηρήθηκε, ότι και η ίδια η ARD1 ρυθμίζεται από την υποξία σε ορισμένες κυτταρικές σειρές, καθώς, μειώνονται τα επίπεδα mRNA και τα πρωτεϊνικά της επίπεδα κατά την υποξία, γεγονός που οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα ακετυλίωσης του HIF-1α.

Επίσης, ο Geng και οι συνεργάτες του συνέδεσαν την ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης 9, 10, 11, 19 και 21 του αμινοτελικού άκρου του HIF-1α, με τη μειωμένη σταθερότητα του και την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων του. Η απακετυλίωση των καταλοίπων αυτών από το ένζυμο HDAC4 (Histone Deacetylase 4) οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α και της μεταγραφικής του ενεργότητας (105).

Αντίθετα, η προσθήκη ακετυλομάδας στα καρβοξυτελικά αμινοξέα λυσίνη-674 και λυσίνη-709, προώθησε την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α και διεγείρει την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του (106), (107). Η ακετυλίωση της λυσίνης-674

πραγματοποιείται από τον PCAF (p300/CBR-associated factor) και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α και τη διευκόλυνση της δέσμευσης σε αυτόν του συμπαραγόντα p300, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του HIF-1α (107). Η ακετυλίωση της λυσίνης-674 οφείλεται στη δραστικότητα ακετυλοτρανσφεράσης του p300. Πιθανολογείται ότι η τροποποίηση αυτή προλαμβάνει την ουβικιτινίωση του HIF-1α και την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα, καθώς το συγκεκριμένο κατάλοιπο λυσίνης υπόκειται επίσης πολυ-ουβικιτινίωση (106).

ο S-νιτροσυλίωση:

Η προσθήκη μονοξειδίου του αζώτου (NO) σε σουλφιδρυλομάδες καταλοίπων κυστεΐνης έχει δείχθει ότι εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (108). Η κυστεΐνη 800 (Cys-800) του HIF-1α αποτελεί στόχο S-νιτροσυλίωσης (Εικόνα 13), με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (109). Ωστόσο, μία μελέτη που αντικρούει την παραπάνω παρατήρηση υποστηρίζει ότι η προσθήκη φορτισμένου NO στο αμινοξύ αυτό, αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF-1α και των p300/CBP (110). Είναι πιθανό λοιπόν η ενεργοποίηση του HIF-1α στην περίπτωση αυτή να οφείλεται στην αλληλεπίδραση με διαφορετικούς συμπαραγόντες της μεταγραφής. Έχει επίσης προταθεί, ότι μία διαφορετική τροποποίηση από το NO στη θέση 533 επάγει τη δράση του HIF-1α, αναστέλλοντας τη δράση της PHD2 άρα και την πρόσδεση του VHL (111), (112).

ο Σουμοϋλίωση:

Ομοίως με την νιτροσυλίωση, ο ρόλος της σουμοϋλίωσης του HIF-1α παραμένει αδιευκρίνιστος, καθώς αναφέρονται αντικρουόμενες παρατηρήσεις από τις ομάδες που τη μελετούν (113). Ο HIF-1α σουμοϋλιώνεται στις λυσίνες 391, 477 και 532 από την RanBP2 E3 λιγάση (Εικόνα 13), η οποία εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά των πυρηνικών πόρων (114). Ωστόσο, ο ρόλος των τροποποιήσεων με την προσθήκη της ομάδας SUMO δεν έχει διευκρινιστεί και υπάρχει διαφωνία σχετικά με το αν επάγουν ή αναστέλλουν τη δράση του HIF-1. Μια σειρά από μελέτες έδειξε ότι η σουμοϋλίωση αυξάνει τη σταθερότητα και την ενεργοποίηση του HIF-1α, ενώ υπάρχουν δεδομένα που αντικρούουν αυτό τον ισχυρισμό, υποστηρίζοντας ότι η σουμοϋλίωση μειώνει τη δράση του HIF-1α και επάγει την ουβικιτινίωσή του μέσω του pVHL (112, 115-118).

ο Φωσφορυλίωση:

Η πιο καλά μελετημένη μετά-μεταφραστική τροποποίηση είναι η φωσφορυλίωση. Πρόκειται για την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας σε κατάλοιπα θρεονίνης, σερίνης ή τυροσίνης (T, S, Y), με δότη κυρίως το ATP, από ένζυμα που ονομάζονται κινάσες. Η αντίστροφη διεργασία ονομάζεται αποφωσφορυλίωση, και καταλύεται από ένζυμα που ονομάζονται φωσφατάσες. Ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλές θέσεις από διάφορες κινάσες σερίνης/θρεονίνης (Εικόνα 13). Η απευθείας φωσφορυλίωση του HIF-1α αποτελεί ένα γρήγορο και αντιστρεπτό μηχανισμό ρύθμισης της δράσης του HIF-1, ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα. Έχουν περιγραφεί τόσο ενεργοποιητικές όσο και ανασταλτικές φωσφορυλίωσεις, ανάλογα με την επικράτεια του HIF-1α στην οποία πραγματοποιούνται και το ρόλο που αυτή διεκπεραιώνει (63).

Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση της καζεΐνης 2 (CK2), έχει δειχθεί ότι επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Η CK2 φωσφορυλιώνει το κατάλοιπο θρεονίνη 796 (Thr796), το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή C-TAD του HIF-1α. Η χρήση αναστολέων ενάντια στη CK2 ή η μετάλλαξη της θέσης φωσφορυλίωσης από την CK2, οδήγησε σε μείωση της δράσης του HIF-1 (119). Η φωσφορυλίωση αυτή δεν επηρεάζει άμεσα την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον συνενεργοποιητή της μεταγραφής p300, αλλά παρεμποδίζει την υδροξυλίωσή του από τον FIH-1 διευκολύνοντας την πρόσδεση της p300 (110).

Αντίθετα, αρνητική είναι η ρύθμιση του HIF-1α από την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β) καθοδικά του μονοπατιού PI3K/Akt. Η GSK3β φωσφορυλιώνει τρία κατάλοιπα σερίνης (Ser551/555/589) εντός της περιοχής ODD του HIF-1α και προάγει την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα, μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από τον VHL, μειώνοντας την ενεργότητα του HIF-1 (120).

Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση της καζεΐνης 1 (CK1) επίσης επηρεάζει αρνητικά τη δράση του (121). Η ισομορφή CK1δ φωσφορυλιώνει την σερίνη 247 στην περιοχή PAS-B, γεγονός που παρεμποδίζει τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT σε συνθήκες υποξίας. Η αναστολή ή αποσιώπηση της CK1δ διεγείρει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, προκαλεί τη συσσώρευση σταγονιδίων λίπους στα κύτταρα και αυξάνει σημαντικά το ρυθμό πολλαπλασιασμού σε συνθήκες υποξίας (122).

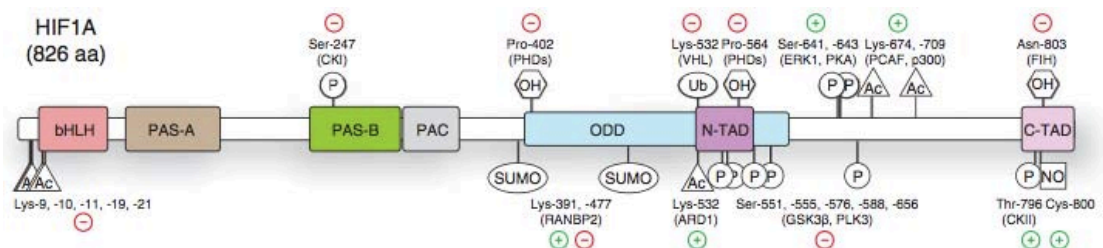
Μια πιο πρόσφατη μελέτη, παρουσιάζει τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από την εξαρτώμενη από την κυκλίνη κινάση 1 (CDK1) (123). Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, η CDK1 φωσφορυλιώνει άμεσα τον HIF-1α στη σερίνη 668 και αναστέλλει την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί μία μοριακή εξήγηση για

την αύξηση των επιπέδων του HIF-1α σε πρωτογενείς και μεταστατικούς όγκους ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του οξυγόνου.

Μία φωσφορυλίωση που, επίσης, σταθεροποιεί τον HIF-1α είναι και αυτή που πραγματοποιείται από την κινάση πρωτεϊνών Α (PKA) στα κατάλοιπα θρεονίνη 63 σερίνης 692. Δείχθηκε ότι η PKA αλληλεπιδρά με τον HIF-1α, τον τροποποιεί στις συγκεκριμένες θέσεις και αναστέλλει την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα από την υδροξυλίωση του από τις PHD. Η ίδια ομάδα ανέφερε ότι η PKA σχετίζεται και με αυξημένη δραστηριότητα της TAD-C περιοχής του HIF-1α επηρεάζοντας, πιθανά, τη μειωμένη υδροξυλίωσης της ασπαραγίνης 803 ανεξάρτητα, όμως, από την φωσφορυλίωση του HIF-1α (124).

Άλλες λιγότερο μελετημένες τροποποιήσεις του HIF-1α περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης 576 και 657 από την PLK3 (polo-like kinase 3), σημαντικού ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του HIF-1α και τη μείωση της δράσης του (125). Επίσης, η φωσφορυλίωση της σερίνης 696 από την κινάση ATM (ataxia-telangiectasia mutated), η οποία σε αντίθεση με την PLK3, προκαλεί τη σταθεροποίηση του HIF-1α και την αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων (63, 126).

Τέλος, μια από τις καλύτερα μελετημένες φωσφορυλίώσεις του HIF-1α είναι αυτή που διαμεσολαβείται από τις ERK1/2 (p44/p42 MAPK) σε απόκριση στην υποξία (127). Η τροποποίηση αυτή επάγει τη δράση του HIF-1α μέσω ενός μηχανισμού που θα παρουσιαστεί αναλυτικά παρακάτω (κεφάλαιο Α.4), και ο ρόλος της αφορά ένα μεγάλο μέρος της παρούσας διατριβής.



Εικόνα 13: Εξαρτώμενες και ανεξάρτητες από το οξυγόνο μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α. Οι τροποποιήσεις του HIF-1α περιλαμβάνουν υδροξυλιώσεις, ακετυλιώσεις, σουμοϋλιώσεις, νιτροσυλιώσεις και φωσφορυλιώσεις που μπορεί να έχουν ενεργοποιητική ή ανασταλτική επίδραση στη δράση του HIF-1 (4).

Ο πίνακας 1 συγκεντρώνει όλα τα γνωστά μονοπάτια και τους παράγοντες που επηρεάζουν τον HIF-1α σε επίπεδο μεταγραφής, μετάφρασης και μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων (73).

Πίνακας 1: Θετική και αρνητική ρύθμιση του HIF-1. Αναγράφονται οι παράγοντες και τα μονοπάτια που επηρεάζουν τον HIF-1α, ο τρόπος και ο μηχανισμός ρύθμισης του.

Λειτουργική κατηγορία / σύμβολο γονιδίου	Θετική ή αρνητική επίδραση στον HIF-1	Ρυθμιστικός μηχανισμός της δράση του HIF-1
<i>Έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου hif-1a</i>		
ISGF3(STAT1/STAT2/IRF9)	Θετική	Σύνδεση στον εκκινητή του γονιδίου του HIF-1α για ενεργοποίηση της έναρξης της μεταγραφής
STAT3	Θετική	Σύνδεση στον εκκινητή του γονιδίου του HIF-1α για ενεργοποίηση της έναρξης της μεταγραφής
NF-κB	Θετική	Σύνδεση στον εκκινητή του γονιδίου του HIF-1α για ενεργοποίηση της έναρξης της μεταγραφής
PI3K/Akt/PKC/HDAC μονοπάτι	Θετική	Ενεργοποίηση της έναρξης της μεταγραφής στην περίπτωση της μετάλλαξης G13997A του μιτοχονδριακού γονιδίου <i>ND6</i>
LY6E	Θετική	Ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt μέσω της μείωσης της έκφρασης του PTEN
NRF-1	Αρνητική	Σύνδεση στον εκκινητή του γονιδίου του HIF-1α για καταστολή της έναρξης της μεταγραφής
<i>Σταθεροποίηση του mRNA του hif-1a</i>		

P-σωμάτια (USP52/PAN2)	Θετική	Αλληλεπίδραση με το 3'UTR του mRNA του HIF-1α για τη σταθεροποίησή του
<i>Έναρξη της μετάφρασης του γονιδίου hif-1α</i>		
YB-1	Θετική	Σύνδεση στη δευτεροταγή δομή του 5'-UTR του mRNA του HIF-1α για ενίσχυση της έναρξης της μετάφρασης
PI3K/Akt μονοπάτι	Θετική	Ενίσχυση της εξαρτώμενης από το κάλυμμα και το IRES έναρξης της μετάφρασης
ATR	Θετική	Επίδραση στα στοιχεία cis της κωδικής περιοχής του mRNA του HIF-1α όταν ενεργοποιείται από στρες της αντιγραφής
<i>Σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF-1α μέσω τροποποίησης της κατάστασης προλυλ-υδροξυλίωσης του</i>		
PHD1, 2, 3	Αρνητική	Υδροξυλίωση των καταλοίπων P402 και P564 του HIF-1α για ουβικιτινίωση
IDH3	Θετική	Αλληλεπίδραση με τις PHD μέσω της μείωσης των επιπέδων του 2OG, όταν υπερεκφράζεται
NQO1	Θετική	Σύνδεση στον HIF-1α και πρόληψη της αλληλεπίδρασής του με τις PHD
SIRT2	Αρνητική	Απακετυλίωση του καταλοίπου K709 του HIF-1α και ενίσχυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και PHD2

<i>Σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF-1α χωρίς τροποποίησης της κατάστασης προλυλ-υδροξυλίωσης του</i>		
HSP90	Θετική	Προστατεύει τον HIF-1α από την RACK1-διαμεσολαβούμενη και PHD-VHL-ανεξάρτητη πρωτεόλυση
GSK-3	Αρνητική	Φωσφορυλίωση των καταλοίπων S551, T555, και S589 του HIF-1α για PHD-VHL-ανεξάρτητη πρωτεόλυση
PLK3	Αρνητική	Φωσφορυλίωση των καταλοίπων S576 και S657 του HIF-1α για PHD- ανεξάρτητη πρωτεόλυση
RSUME	Θετική	Σουμοϋλίωση του HIF-1α για σταθεροποίησή του
SET7/9	Αρνητική	Μεθυλίωση του HIF-1α στο κατάλοιπο K32 για ουβικιτινίωση και πρωτεόλυσή του με PHD-VHL- ανεξάρτητο τρόπο
SENP1	Θετική	Απο-σουμοϋλίωση του HIF-1α για αναστολή της VHL-εξαρτώμενης ουβικιτινίωσης με PHD- ανεξάρτητο τρόπο
LSD1	Θετική	Απο-μεθυλίωση του HIF-1α στο κατάλοιπο K32 για καταστολή της PHD-VHL-ανεξάρτητης πρωτεόλυσης
<i>Σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF-1α μέσω τροποποίησης της κατάστασης ουβικιτινίωσής του</i>		

VHL	Αρνητική	Ουβικιτινιλίωση του HIF-1α για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα
VDU (επίσης και USP20)	Θετική	Απο-ουβικιτινιλίωση του HIF-1α για σταθεροποίησή του
USP8	Θετική	Απο-ουβικιτινιλίωση του HIF-1α για σταθεροποίησή του
UCHL1	Θετική	Απο-ουβικιτινιλίωση του HIF-1α για σταθεροποίησή του
<i>Πυρηνική συσσώρευση</i>		
Dynein	Θετική	Αλληλεπίδραση με το NLS του HIF-1α για τη συσσώρευσή του στον πυρήνα
AMPK/HDAC μονοπάτι	Θετική	Πυροδότηση της μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα και προώθηση της αλληλεπίδρασης HIF-1α-HSP90
MAPK (ERK1/2)	Θετική	Φωσφορυλίωση των καταλοίπων S641 και S643 για πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α
<i>Σχηματισμός ετεροδιμερούς</i>		
CK1δ	Αρνητική	Φωσφορυλίωση του καταλοίπου S247 του HIF-1α για αναστολή της αλληλεπίδρασης με τον HIF-1β
<i>Ενεργοποίηση της δράσης του HIF-1α</i>		
FIH-1	Αρνητική	Υδροξυλίωση του καταλοίπου N803 του HIF-1α για αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και p300/CBP
SIRT1	Αρνητική	Αναστολή της αλληλεπίδρασης HIF-1α-p300/CBP μέσω απακετυλίωσης του καταλοίπου

XBP1	Θετική	K647 του HIF-1α, που ακετυλιώνεται από την PCAF
IDH3	Θετική	Σχηματισμός μεταγραφικού συμπλόκου με τον HIF-1α και προσέλκυση της RNA πολυμεράσης II
		Αλληλεπίδραση με τον FIH-1 μέσω της μείωσης των επιπέδων του 2OG όταν υπερεκφράζεται

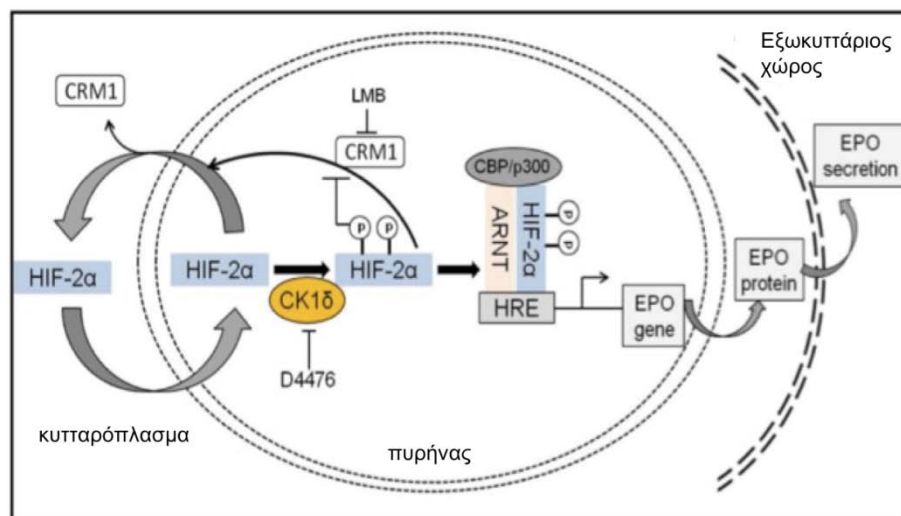
A.3.2.4 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης

Σημαντικές είναι επίσης οι φωσφορυλιώσεις που ελέγχουν τη δράση του HIF-2α. Έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο θρεονίνης Thr324 από την κινάση της πρωτεΐνης D1 (PKD1), με αποτέλεσμα την αναστολή της αλληλεπίδρασής του με το μεταγραφικό παράγοντα SP1 (Specificity Protein 1) και την επαγωγή της έκφρασης του απαραίτητου για την επιδιόρθωση του DNA παράγοντα νιμπρίνη (NSBS1) (128). Η φωσφορυλίωση αυτή φαίνεται να εξαρτάται από ένα γειτονικό κατάλοιπο προλίνης, το οποίο είναι μοναδικό στον HIF-2α, με αποτέλεσμα ο HIF-1α να μη φωσφορυλιώνεται στην αντίστοιχη θρεονίνη Thr-322, και έτσι να καταστέλλεται η δράση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA λόγω μη σύνδεσης με τον MYC (proto-oncogene protein) αλλά με τον SP1. Τα παραπάνω, αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα του πώς μια μετά-μεταφραστική τροποποίηση των υπομονάδων HIF-α, μπορεί να επηρεάσει διακριτά την αλληλεπίδρασή τους με συμπαραγόντες, οδηγώντας σε διαφορετικές λειτουργίες και διαφορετικούς φαινοτύπους (3, 128).

Επίσης, ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από την κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) στο συντηρημένο κατάλοιπο θρεονίνης Thr844 της επικράτειας C-TAD, και με τρόπο αντίστοιχο με την φωσφορυλίωση του HIF-1α από την ίδια κινάση, οδηγεί στην αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας (129), μειώνοντας τη συγγένεια του HIF-2α με τον ανασταλτικό παράγοντα FIH και την αντίστοιχη υδροξυλίωση στην ασπαραγίνη 847.

Τέλος, η πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένη φωσφορυλίωση του HIF-2α είναι αυτή που πραγματοποιείται από την κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ). Η CK1δ φωσφορυλιώνει τον HIF-2α σε δύο αμινοξικά κατάλοιπα (Ser383 και Thr528) και, έτσι, προωθεί την πυρηνική συσσώρευσή του HIF-2α με αποτέλεσμα την αύξηση της εκκρινόμενης ερυθροποιητίνης

(EPO) σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, εμποδίζοντας ένα μηχανισμό πυρηνικής εξαγωγής που εμπλέκει την εξπορτίνη CRM1 (130) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Η φωσφορυλίωση του HIF-2α από την CK1δ επάγει τη μεταγραφική του ενεργότητα. Σε συνθήκες υποξίας ο HIF-2α σταθεροποιείται και εισάγεται στον πυρήνα, αλλά εξαγεται γρήγορα στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξπορτίνης CRM1. Η φωσφορυλίωση του από την CK1δ στα κατάλοιπα Ser383 και Thr528 δεν επιτρέπει την εξαγωγή του από τον πυρήνα. Έτσι, ο HIF-2α συσσωρεύεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται με τον ARNT, επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της EPO επιτρέποντας, έτσι, την αύξηση των επιπέδων της εκκρινόμενης EPO (130), τροποποιημένη.

A.4 Έλεγχος της δράσης του HIF-1α από τις ERK1/2

Το μονοπάτι των MAPK, μαζί με αυτό της PI3K/Akt, αποτελούν τα γνωστότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν, ποικιλοτρόπως, τον HIF-1α. Το μονοπάτι των MAPK ε πάγεται από αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, ογκογονίδια, αλλά κι από την υποξία και επηρεάζει εκτός από τη μετάφραση του mRNA του HIF-1α, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, και τη μεταγραφική του ενεργοποίηση. Έχει δειχθεί η άμεση στόχευση του HIF-1α από τις ERK1/2 (p42/44 MAPK), με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργοποίησής του (127), ενώ δεν αποτελεί στόχο των υπόλοιπων μελών της οικογένειας των MAPK (p38 ή c-JNK) (131). Σε αντίθεση με τις τροποποιήσεις που αναφέρθηκαν και ρυθμίζουν τη σταθερότητα του HIF-1α (από τις GSK3, PLK3, ATM, CDKI), ή τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT (CK1δ), η φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2 επηρεάζει άμεσα τη δράση του.

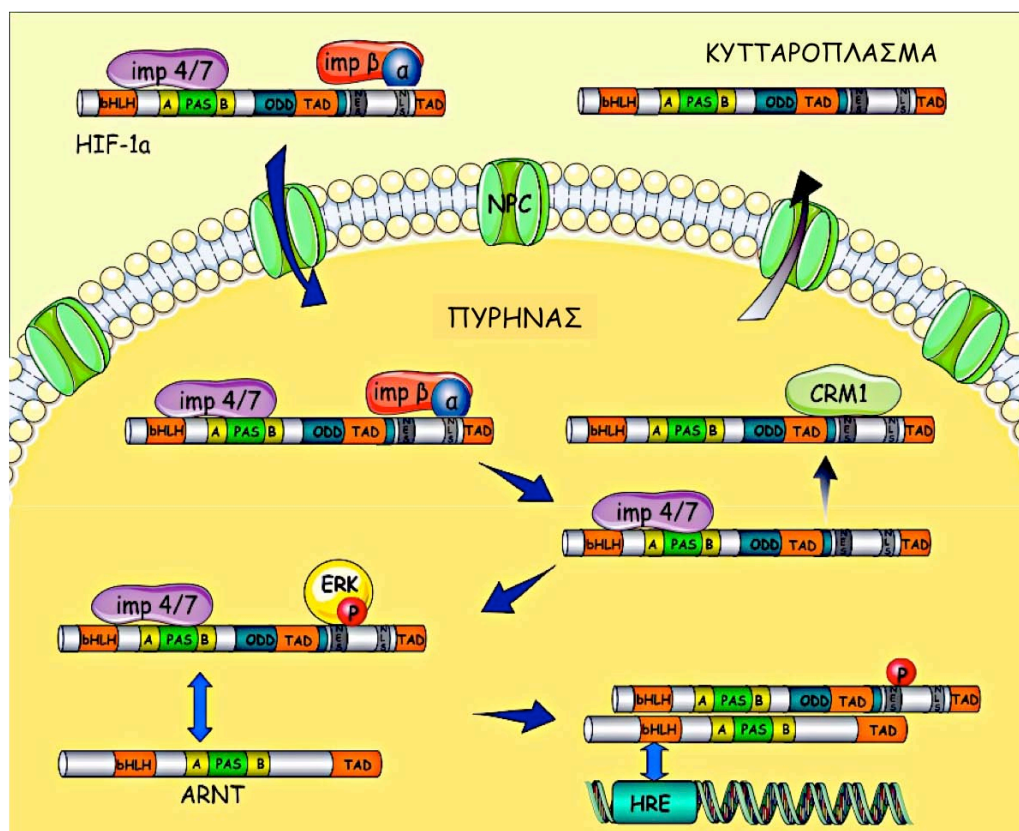
Δεδομένα του εργαστηρίου Βιοχημείας έδειξαν πως οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν άμεσα δύο συντηρημένα κατάλοιπα σερίνης (Ser641 και Ser643) (127) που εντοπίζονται εντός μιας μικρής καρβοξυτελικής περιοχής 43 αμινοξέων του HIF-1α, που έχει ο ριστεί ως ETD

(ERK1/2 Targeted Domain, αμινοξέα 616-658). Η συγκεκριμένη περιοχή, εκτός των θέσεων φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, περιλαμβάνει και το γειτονικό σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (NES, αμινοξέα 632-639).

Η υπερέκφραση σε κύτταρα HeLa μιας μεταλλαγμένης μορφής του HIF-1α στην οποία έχουν καταργηθεί οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (Ser641 σε Ala και Ser643 σε Ala), έδειξε ότι έχει κυρίως κυτταροπλασματικό εντοπισμό και πολύ χαμηλή μεταγραφική ενεργότητα. Παρόλα αυτά, κατεργασία των κυττάρων αυτών με Leptomycin B, έναν ειδικό αναστολέα της εξαπορτίνης CRM1, είχε ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωση της μεταλλαγμένης μορφής του HIF-1α στον πυρήνα και επανάκτηση της δράσης του. Έτσι προτάθηκε ότι η απουσία φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 μειώνει την πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α λόγω της εξαγωγής του στο κυτταρόπλασμα (127). Επιπλέον, αναστολή του μονοπατιού των MAPK, με τη χρήση του αναστολέα της MEK1, PD98059, φυσικών προϊόντων και στέρηση ορού, οδήγησε σε μετατόπιση του ενδογενούς HIF-1α στο κυτταρόπλασμα και απώλεια της μεταγραφικής του ενεργότητας, μειώνοντας την έκφραση των γονιδίων που ελέγχονται αποκλειστικά από τον HIF-1 (132-134). Σημαντική, επίσης, είναι η παρατήρηση ότι παρά την απώλεια της μεταγραφικής του ενεργότητας, ο HIF-1α που εκτοπίζεται από τον πυρήνα δεν διαχέεται στο κυτταρόπλασμα αλλά εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων μέσω της αλληλεπίδρασης του με τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη μορταλίνη (Mortalin/GRP75). Εκεί συμμετέχει, μαζί με τη μορταλίνη, σε ένα σύμπλοκο με την εξοκινάση II και το κανάλι ιόντων VDAC1 (Voltage-dependent anion-selective channel 1), προστατεύοντας τα κύτταρα από την απόπτωση (133). Η υπερέκφραση μορφών του HIF-1α που φέρουν μεταλλάξεις που μιμούνται τη φωσφορυλίωση (Ser641 σε Glu) ή καταστρέφουν το NES, εντοπίζονται αποκλειστικά στον πυρήνα και καθίστανται ανθεκτικές σε μεγάλο βαθμό στην αναστολή του μονοπατιού των MAPK (34).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, όταν το μονοπάτι των ERK1/2 είναι ανενεργό, ο HIF-1α εισάγεται μεν στον πυρήνα αλλά εξάγεται γρήγορα εξαιτίας της αλληλεπίδρασής του μέσω του NES με την εξαπορτίνη CRM1. Αποτέλεσμα αυτού είναι η μεταγραφική του δράση να παραμένει χαμηλή. Ταυτόχρονα, ό μως, η δέσμευση του μέσω της μορταλίνης στα μιτοχόνδρια εξασφαλίζει την επιβίωση των κυττάρων (133). Ενεργοποίηση του μονοπατιού των ERK1/2 έχει σαν αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του HIF-1α στις σερίνες 641/643 με άμεσο αποτέλεσμα την απόκρυψη του γειτονικού σήματος NES και την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασής του HIF-1α με τη CRM1 (34). Ο μηχανισμός αυτός εξασφαλίζει την συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, τον ετεροδιμερισμό με τον ARNT και την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων της υποξίας (Εικόνα 15). Επομένως, ο

μηχανισμός με τον οποίο οι ERK1/2 επάγουν τη δράση του HIF-1α περιλαμβάνει τη ρύθμιση της εξαγωγής του από τον πυρήνα (62).



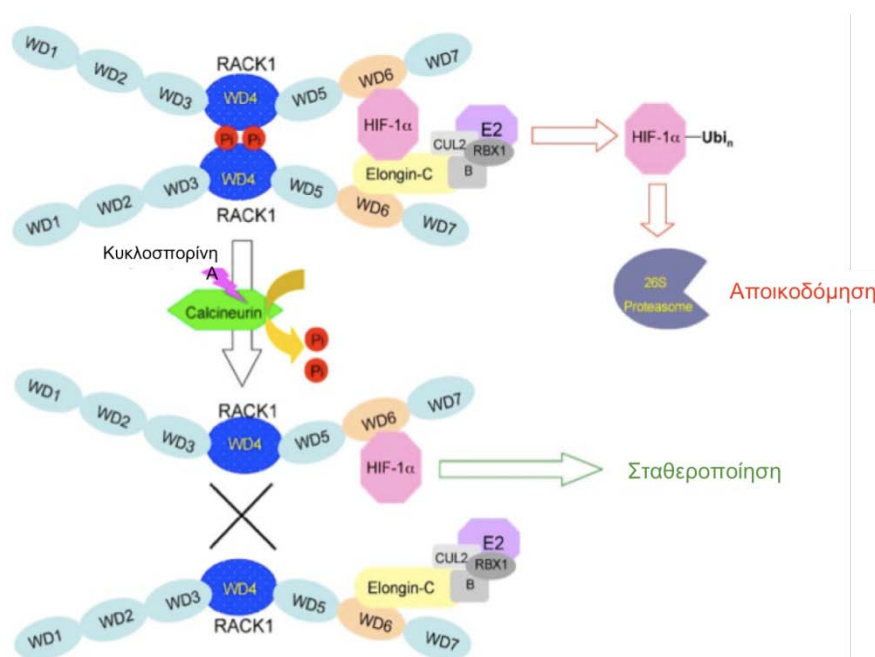
Εικόνα 15: Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 επάγει απευθείας τη μεταγραφική του ενεργότητα, ρυθμίζοντας τη μετακίνησή του μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Μετά τη σταθεροποίησή του, ο HIF-1α αλληλεπιδρά με υποδοχείς εισαγωγής στον πυρήνα (ιμπορτίνες α/β, 4 και 7) και εισάγεται μέσα στον πυρήνα μέσω των συμπλόκων πυρηνικού πόρου (Nuclear Pore Complexes, NPCs). Εξάγεται, όμως, γρήγορα στο κυτταρόπλασμα μέσω της αλληλεπίδρασης με την εξπορτίνη CRM1 που διαμεσολαβείται από το NES του. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 καλύπτει το NES και αναστέλλει την αλληλεπίδρασή με τη CRM1. Ακολουθεί η συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα εξασφαλίζοντας τη μέγιστη μεταγραφική του ενεργότητα (62), τροποποιημένη.

Δοκιμές υπερέκφρασης διαφόρων μορφών της μικρής περιοχής ETD σαν ανεξάρτητο πεπτιδίον, έδειξαν ότι η αγρίου τύπου μορφή του πεπτιδίου ανέστειλε τη δράση του ενδογενούς HIF-1α σε κύτταρα HeLa και Huh7, ανταγωνιζόμενο τον πλήρους μεγέθους HIF-1α. Αντίθετα, η χρήση της μεταλλαγμένης μορφής του πεπτιδίου ETD που δεν φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 άφησε την ενεργότητα του HIF-1α ανεπηρέαστη (34) (62). Απόρροια των παραπάνω παρατηρήσεων είναι η υπόθεση αν οι διάφορες μορφές του πεπτιδίου ETD θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εκτενέστερη μελέτη της σημασίας της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2 στην κυτταρική απόκριση στην υποξία.

A.5 Ρύθμιση του HIF-1 από φωσφατάσες

Παρόλο που ο ρόλος των κινασών στη ρύθμιση της δράσης των HIF-α και την κυτταρική απόκριση στην υποξία έχει μελετηθεί εκτενώς, πολύ λίγα είναι γνωστά για τις φωσφατάσες που επηρεάζουν τους HIF-α. Οι φωσφατάσες είναι τα ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των φώσφο-εστερικών δεσμών των φωσφορυλιωμένων αμινοξέων και απομακρύνουν φωσφορικές ομάδες που προστέθηκαν από τις κινάσες. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ομαδοποιούνται σε τρεις βασικές κατηγορίες, τις φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης (PSP), τις φωσφατάσες τυροσίνης (PTP) και τις φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης (DUSP), οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν τόσο κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης όσο και τυροσίνης στις πρωτεΐνες-στόχους τους (135, 136).

Υπάρχουν λίγες αναφορές στη βιβλιογραφία για τη ρύθμιση της δράσης του HIF-1α από φωσφατάσες. Σύμφωνα με τον Liu και τους συνεργάτες του, η καλσινευρίνη, μια φωσφατάση με πολλαπλούς ρόλους, προωθεί την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων και της δράσης του HIF-1α, αναστέλλοντας τη RACK1-εξαρτώμενη αποικοδόμησή του (137). Όπως αναφέρθηκε, η RACK1 επάγει την αποικοδόμηση του HIF-1α με ανεξάρτητο του οξυγόνου και του VHL τρόπο. Η καλσινευρίνη αποφωσφορυλιώνει τη RACK1 παρεμποδίζοντας έτσι τον διμερισμό της και κατ' επέκταση την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την Elongin-C, γεγονός που προωθεί τη σταθεροποίησή του (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Η καλσινευρίνη επάγει τη σταθεροποίηση του HIF-1α μέσω της αποφωσφορυλίωσης της RACK1. Η καλσινευρίνη αποφωσφορυλιώνει τη RACK1, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται ο διμερισμός της και να αναστέλλεται η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την Elongin-C, που είναι συνδεδεμένοι στην περιοχή WD6

του κάθε μονομερούς της RACK1. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ουβικιτινίωσης του HIF-1α και την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα (137), τροποποιημένη.

Επίσης, πολλά από τα μέλη της οικογένειας των φωσφατασών διπλής ειδίκευσης (DUSP) επηρεάζουν έμμεσα τη δράση του HIF-1α. Έχειδειχθεί ότι οι DUSP αποτελούν αναστολείς των MAPK, γι' αυτό ονομάζονται και φωσφατάσες των MAPK (MKP, MAPK phosphatases) (Πίνακας 2) (138), και ως εκ τούτου έχουν αποδοθεί σε αυτές σημαντικοί βιολογικοί ρόλοι (139). Οι DUSP αποφωσφορυλιώνουν άμεσα διάφορα μέλη της οικογένειας των MAPK.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αποφωσφορυλίωση και απενεργοποίηση των ERK1/2, οι οποίες όπως αναφέρθηκε, διαμεσολαβούν στην επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Οι φωσφατάσες DUSP2, DUSP6, DUSP7 και DUSP9 φαίνεται να παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς την επιλογή των ERK1/2 ως υποστρώματά τους (140) (141), (142-144), (145). Άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι και άλλα μέλη της οικογένειας των DUSP παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των ERK1/2, όπως οι DUSP4, DUSP5, DUSP9 και DUSP14 (146-148).

Κάποιες από τις φωσφατάσες αυτές έχειδειχθεί ότι συνδέονται με το μονοπάτι της υποξίας (149), (150). Η φωσφατάση DUSP1 (MKP1), η οποία επάγεται μεταγραφικά από την υποξία (151), ρυθμίζει αρνητικά τη δράση του HIF-1α, αποφωσφορυλιώνοντας και απενεργοποιώντας τις ERK1/2 (152). Τέλος, μια καινούρια μελέτη συσχετίζει και την ενεργοποίηση των φωσφατασών DUSP9 και DUSP16 με το μονοπάτι της υποξίας (153). Συγκεκριμένα, δείχνει ότι η επαγόμενη αύξηση της έκφρασης της DUSP 9 και μείωση της έκφρασης της DUSP 16 μέσω ενός εξαρτώμενου από τον HIF-1α μηχανισμού, ως απόκριση στη χημειοθεραπεία, ελέγχει τη δράση των κινασών ERK και p38 MAPK.

Πίνακας 2: Οι φωσφατάσες των MAP κινασών της οικογένειας DUSP. Στον πίνακα φαίνονται τα μέλη της οικογένειας των DUSP, η υποκυτταρική κατανομή τους και τα μέλη της οικογένειας των MAPK που αποφωσφορυλιώνουν (140).

Τάξη	Άλλο όνομα	Υποκυτταρικός εντοπισμός	Προτίμηση υποστρώματος		
			ERK1/2	p38	JNK
<i>Τάξη I</i>					
DUSP1	MKP-1, CL-100, erp, 3CH134, hVH1	Πυρήνας	X	X	X
DUSP2	PAC-1	Πυρήνας	X	X	
DUSP4	MKP-2, Typ1, Sty8, hVH2	Πυρήνας	X	X	X
DUSP5	hVH-3, B23	Πυρήνας	X		
<i>Τάξη II</i>					
DUSP6	MPK-3, Pyst1, rVH6	Κυτταρόπλασμα	X		
DUSP7	MPK-X, Pyst2, B59	Κυτταρόπλασμα	X		
DUSP9	MPK-4, Pyst3	Κυτταρόπλασμα	X	x	
<i>Τάξη III</i>					
DUSP8	M3/6, hVH5, HB5	Πυρήν/κυτταρόπλ		X	X
DUSP10	MKP-5	Πυρήν/κυτταρόπλ		X	X
DUSP 16	MKP-7	Πυρήν/κυτταρόπλ		X	X

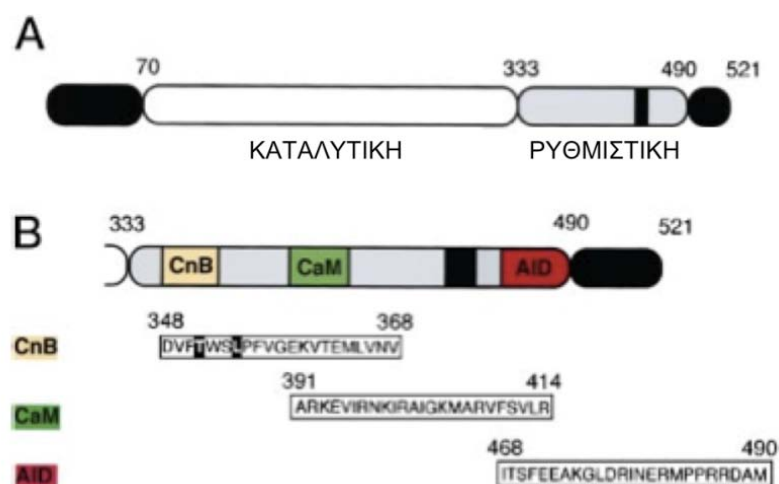
A.6 Οι υπό μελέτη φωσφατάσες

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο ρόλος δύο φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης στη ρύθμιση της δράσης των HIF-α.

A.6.1 Η φωσφατάση καλσινευρίνη (PPP3CA, CnA)

Η καλσινευρίνη είναι μια κυτταροπλασματική φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης, η δράση της οποίας ρυθμίζεται από τη συγκρότηση του συμπλόκου Ca^{2+} /καλμοδουλίνης. Είναι διμερές αποτελούμενο από μια καταλυτική υπομονάδα (PPP3CA, CnA) μεγέθους ~61 kDa και μια ρυθμιστική υπομονάδα (PPP3R, CnB) μεγέθους 19 kDa. Έχουν χαρακτηριστεί τρεις διαφορετικές ισομορφές για την καταλυτική υπομονάδα (PPP3CAa, PPP3CAb, PPP3CAc) που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, και δύο ισομορφές για τη ρυθμιστική υπομονάδα (PPP3R1, PPP3R2) (154).

Η δομή της PPP3CA είναι πολύ συντηρημένη και αποτελείται από δύο κύριες επικράτειες, την καταλυτική (αμινοξέα 70-328) και την ρυθμιστική (αμινοξέα 333-490). Η ρυθμιστική επικράτεια περιέχει 3 μικρές υποπεριοχές, την περιοχή αλληλεπίδρασης με τη ρυθμιστική υπομονάδα (CnB), την περιοχή δέσμευσης της καλμοδουλίνης μετά την ενεργοποίησή της από το Ca^{2+} (CaM) και την περιοχή αυτό-αναστολής (AID) (Εικόνα 17) (155, 156).



Εικόνα 17: Δομική οργάνωση της καλσινευρίνης. Α) Σχηματική αναπαράσταση της καταλυτικής υπομονάδας της καλσινευρίνης. Β) Αναπαράσταση των υποπεριοχών της ρυθμιστικής περιοχής της καταλυτικής υπομονάδας της καλσινευρίνης. Αναγράφονται τα όρια και η αμινοξική αλληλουχία της κάθε υποπεριοχής. Με μαύρη σκίαση επισημαίνονται τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση με την κυκλοφιλίνη και τον FKBP12 (156), τροποποιημένη.

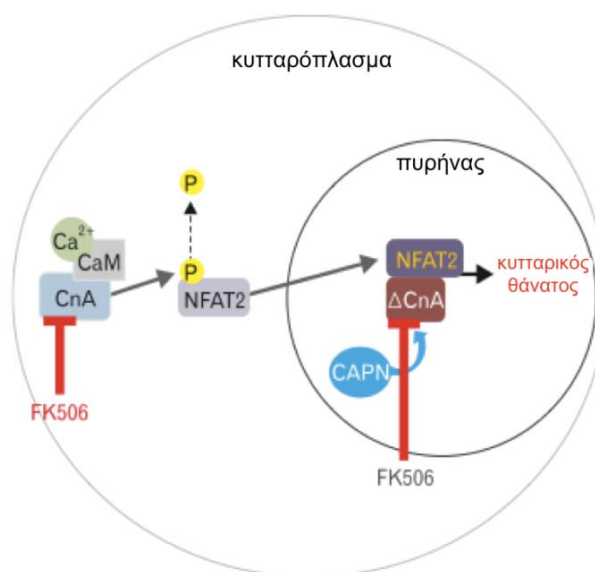
Στην υποπεριοχή δέσμευσης της ρυθμιστικής υπομονάδας CnB, επιδρούν και οι δύο καλά χαρακτηρισμένοι και ευρέως χρησιμοποιούμενοι αναστολείς της καλσινευρίνης. Πρόκειται για τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα κυκλοσπορίνη Α (CsA) και FK506 ή τακρόλιμους (157, 158). Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν τη δράση της καλσινευρίνης έμμεσα. Η CsA δεσμεύεται στην κυτταροπλασματική πρωτεΐνη κυκλοφιλίνη και ο FK506 δεσμεύεται σε μια πρωτεΐνη της οικογένειας των ανοσοφιλινών με μέγεθος 12 kDa, την FKBP12 (FK-binding protein 12). Τα σύμπλοκα CsA-κυκλοφιλίνη και FK506-FKBP12 στη συνέχεια αλληλεπιδρούν με την καλσινευρίνη στην περιοχή δέσμευσης της ρυθμιστικής υπομονάδας (Εικόνα 17) και αναστέλλουν τη δράση της (159-161). Τα σύμπλοκα CsA-κυκλοφιλίνη και FK506-FKBP12 δρουν ως μη συναγωνιστικοί αναστολείς, παρά την έλλειψη δομικής ομολογίας μεταξύ των δύο συμπλόκων (162, 163). Επίσης, έχειδειχθεί ότι πέραν της καλσινευρίνης, οι CsA και FK506 αναστέλλουν τη δράση και άλλων σηματοδοτικών μορίων, όπως διαφόρων MAP κινασών, μέσω διακριτών μηχανισμών, εξαιτίας των διαφορετικών συμπλόκων που σχηματίζουν (157). Πρόσφατα έχει χαρακτηριστεί ένας νέος αναστολέας της καλσινευρίνης, ο οποίος αλληλεπιδρά άμεσα με τη φωσφατάση, η isogarcinol. Υπάρχουν δύο θέσεις δέσμευσης της στην καλσινευρίνη και μάλιστα στην καταλυτική περιοχή της φωσφατάσης. Έτσι η isogarcinol λειτουργεί ως συναγωνιστικός αναστολέας, παρεμποδίζοντας την εκδήλωση της δράσης φωσφατάσης της καλσινευρίνης. Η isogarcinol

εμφανίζει χαμηλότερη τοξικότητα αλλά ισχυρό ανοσοκατασταλτικό αποτέλεσμα σε σχέση με τα φάρμακα CsA και FK506 (164, 165).

Στην ανενεργή της μορφή η καταλυτική περιοχή της καλσινευρίνης αποκρύπτεται από την αυτό-ανασταλτική περιοχή (AID) που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό της άκρο. Για την ενεργοποίησή της απαιτείται η σύνδεση της ρυθμιστικής υπομονάδας (CnB) ή της καλμοδουλίνης. Η σύνδεση αυτή επάγεται από την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του Ca^{2+} . Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η δράση φωσφατάσης της καλσινευρίνης ρυθμίζεται από τα επίπεδα Ca^{2+} μέσα στο κύτταρο. Έχειδειχθεί, ότι ουσίες που επάγουν την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} προκαλούν την ενεργοποίηση της καλσινευρίνης. Μια τέτοια ουσία είναι η ιονομυκίνη, ένα ιονοφόρο που παράγεται από το βακτηριακό στέλεχος *Streptomyces conglobatus* κι έχει την ικανότητα να μεταφέρει κατιόντα και κυρίως Ca^{2+} δια μέσου της φωσφολιπιδικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου (166). Το Ca^{2+} δεσμεύεται τόσο στην καλμοδουλίνη όσο και στην CnB, οι οποίες είναι δομικά όμοιες αλλά διαφέρουν πολύ λειτουργικά. Η σύνδεση της ρυθμιστικής υπομονάδας CnB, έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης της καταλυτικής υπομονάδας και την απελευθέρωση του ανασταλτικού καρβοξυτελικού άκρου AID (154, 167). Επομένως, είναι πολύ σημαντική για την ενεργοποίηση της ενζυμικής δράσης της καλσινευρίνης. Η σύνδεση του συμπλόκου Ca^{2+} /καλμοδουλίνης, επίσης προκαλεί την ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας, αλλά η απομάκρυνση της AID περιοχής αφήνει τη φωσφατάση «απροστάτευτη» έναντι της δισμουτάσης του υπεροξειδίου, κι αυτό εξηγεί το ρόλο της καλμοδουλίνης στην οξειδωτική απενεργοποίηση της καλσινευρίνης (156). Έχειδειχθεί ότι η μορφή της καλσινευρίνης που δεν διαθέτει την περιοχή δέσμευσης της καλμοδουλίνης (CaM, εικόνα 17), αλλά μπορεί να δεσμεύσει την ρυθμιστική υπομονάδα CnB, έχει 10 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για το Ca^{2+} σε σχέση με το αγρίου τύπου ένζυμο (168).

Η καλσινευρίνη είναι μια πολυλειτουργική φωσφατάση που διαθέτει ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων. Έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διεργασίες, καθώς εμπλέκεται σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια και ρυθμίζει θετικά ή αρνητικά τη δράση πολλών μεταγραφικών παραγόντων (NFAT, NF- κ B, AP1). Ο πιο γνωστός ρόλος που της έχει αποδοθεί, είναι η εμπλοκή της στην έναρξη της ανοσιακής απόκρισης και την ενεργοποίηση των T -λεμφοκυττάρων. Έχειδειχθεί ότι η καλσινευρίνη αποφωσφορυλιώνει άμεσα τον πυρηνικό παράγοντα των ενεργοποιημένων T -λεμφοκυττάρων, NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells). Η αποφωσφορυλίωση αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση του NFAT, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και ως μεταγραφικός παράγοντας επάγει τη μεταγραφή γονιδίων και οδηγεί σε απελευθέρωση των ιντερλευκινών -

2, -3, -4, της ιντερφερόνης γ και του παράγοντα νέκρωσης των όγκων- α , TNF α , διεγείροντας μια σειρά ανοσιακών απαντήσεων (169, 170). Επίσης, μια πρόσφατη μελέτη πάνω στο ρόλο της καλσινευρίνης στη ρύθμιση του NFAT, υπέδειξε την ύπαρξη μιας μικρότερης μορφής της φωσφατάσης, η οποία εντοπίζεται μαζί με τον NFAT στον πυρήνα, και αναστέλλεται επίσης από τον ανοσοκατασταλτικό παράγοντα FK506 (171, 172) (Εικόνα 18). Η μορφή αυτή της φωσφατάσης σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει μετά από πέψη της καλσινευρίνης από το ένζυμο καλπαΐνη. Η πρωτεόλυση αυτή πραγματοποιείται μετά την είσοδο της καλσινευρίνης στον πυρήνα.



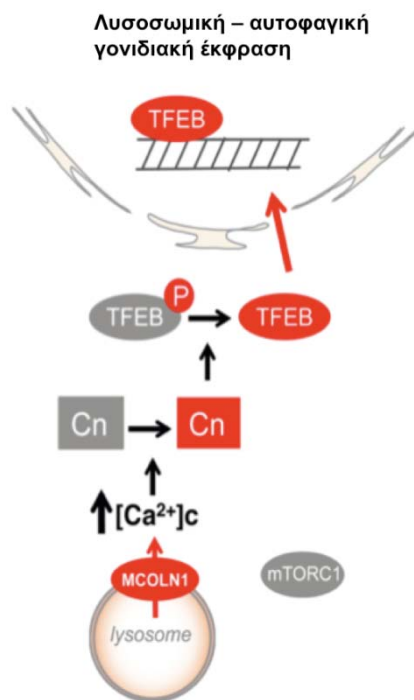
Εικόνα 18: Ο ρόλος της καλσινευρίνης στην επαγωγή της ανοσιακής απόκρισης. Η καλσινευρίνη αποφωσφορυλιώνει άμεσα και επάγει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT. Η ενεργοποίηση του NFAT έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ιντερλευκινών και άλλων παραγόντων που σηματοδοτούν την ανοσιακή απάντηση. Τόσο η κυτταροπλασματική, όσο και η μικρότερη-πυρηνική μορφή της φωσφατάσης αναστέλλονται από τον FK506 (171), τροποποιημένη.

Έχει επίσης δειχθεί ότι η καλσινευρίνη διαμεσολαβεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B σε απόκριση στην ενεργοποίηση των TCR (υποδοχείς των T-κυττάρων). Σε αντίθεση με την περίπτωση του NFAT, η επίδραση της καλσινευρίνης στην επαγωγή του NF- κ B είναι έμμεση και πραγματοποιείται μέσω της ρύθμισης της συγκρότησης του συμπλόκου CBM. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τις πρωτεΐνες Carma1 (CARD-containing MAGUK protein 1), Bcl10 (B-cell lymphoma/leukemia 10) και Malt1 (Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1). Απαραίτητη προϋπόθεση για τη συγκρότηση του συμπλόκου είναι η φωσφορύλωση της Carma1 και η

αποφωσφορυλίωση του Bcl10. Η αποφωσφορυλίωση αυτή πραγματοποιείται από την καλσινευρίνη, η οποία ενεργοποιείται από την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} , που επάγεται από την ενεργοποίηση των TCR (T-cell receptor). Ο σχηματισμός του συμπλόκου CBM οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κB, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (173).

Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές μελέτες που εμπλέκουν την καλσινευρίνη με την προώθηση του κυτταρικού θανάτου, είτε μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της απόπτωσης (174), είτε ρυθμίζοντας την αυτοφαγία. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η καλσινευρίνη αποφωσφορυλιώνει άμεσα την πρωτεΐνη Drp1 (dynamin-related protein 1), προωθώντας τη σχάση των μιτοχονδρίων, κατάσταση που χαρακτηρίζει τα πρώιμα στάδια της απόπτωσης (175). Άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η καλσινευρίνη αποφωσφορυλιώνει την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BAD, οδηγώντας στην αποδέσμευσή της από τις 14-3-3-πρωτεΐνες με αποτέλεσμα τον εντοπισμό της στα μιτοχόνδρια όπου συμπλέκεται με την Bcl-x_L. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-x_L και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, που ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι και την επαγωγή της εκτελεστικής κασπάσης 3. Η επίδραση της καλσινευρίνης στην έναρξη της απόπτωσης μέσω της αποφωσφορυλίωσης της BAD, έχειδειχθεί *in vitro* και *in vivo* (176-178).

Πρόσφατα περιγράφηκε ότι η απελευθέρωση Ca^{2+} από τα λυσοσώματα μέσω της μουκολιπίνης 1 (MCOLN1), ενεργοποιεί την καλσινευρίνη, η οποία δεσμεύεται στον παράγοντα TFEB (Transcription Factor EB) και τον αποφωσφορυλιώνει, προάγοντας τη συσσώρευσή του στον πυρήνα. Εκεί ο TFEB εκδηλώνει το ρόλο του ως κύριος μεταγραφικός ρυθμιστής ο οποίος καθορίζει τη βιογένεση των λυσοσωμάτων και την αυτοφαγία (179) (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Ο ρόλος της καλσινευρίνης στην επαγωγή της αυτοφαγίας. Σε καταστάσεις πείνας και φυσικής άσκησης απελευθερώνεται Ca^{2+} από τα λυσοσώματα. Το Ca^{2+} ενεργοποιεί τη ν καλσινευρίνη, η οποία αποφωσφορυλιώνει το μεταγραφικό παράγοντα TFEB, με αποτέλεσμα τη μετατόπισή του πύ το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Εκεί ο TFEB επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη βιογένεση των λυσοσωμάτων και την αυτοφαγία (179), τροποποιημένη.

Η καλσινευρίνη έχει συσχετιστεί, επίσης, και με την παρεμπόδιση της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση, μέσω της αναστολής της δράσης του παράγοντα Stat3. Ο Stat3 έχει διπλή λειτουργία και εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης (180). Η δράση του όπως περιγράφηκε προηγουμένως, ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση του καταλοίπου Y705. Έχει δείχθει, ότι η αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης Ca^{2+} μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα IP3 (inositol triphosphate), οδηγεί σε αύξηση της δράσης της καλσινευρίνης, η οποία προωθεί την αποικοδόμηση του παράγοντα Stat3. Η μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων και της φωσφορυλιωμένης του μορφής αναστέλλει την έκφραση παραγόντων που διαμεσολαβούν την κυτταρική επιβίωση (181, 182).

Επιπρόσθετα, η καλσινευρίνη παίζει ρόλο στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Η αναδιοργάνωση της ακτίνης διαμεσολαβεί σημαντικές διεργασίες των κυττάρων, όπως η μετανάστευση, οι αλλαγές στη μορφολογία και τον σχηματισμό μεταφορικών κυστιδίων. Ως απόκριση σε σήματα που αυξάνουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} η καλσινευρίνη

ενεργοποιείται και αποφωσφορυλιώνει την φωσφατάση SSH1L (Slingshot-1L), η οποία εμφανίζει μεγάλη εξειδίκευση υποστρώματος. Η SSH1L αποφωσφορυλιώνει αποκλειστικά την πρωτεΐνη κοφιλίνη, η οποία συνδέεται στα μονομερή της ακτίνης και διεγείρει τον αποπολυμερισμό των νηματίων ακτίνης (183). Κι άλλες ομάδες έχουν προτείνει διαφορετικούς μηχανισμούς για τη ρύθμιση της σταθερότητας της f-ακτίνης δια μέσω της καλσινευρίνης. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA (N-methyl-D-aspartate receptor) στους νευρώνες έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της καλσινευρίνης, η οποία παίζει ρόλο στη σταθερότητα της f-ακτίνης (184).

Τέλος, όπως αναφέρθηκε, η καλσινευρίνη φαίνεται να επηρεάζει έμμεσα το μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α, για τον οποίο έχει προταθεί ένας μηχανισμός που πραγματοποιείται σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου και σε κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL (137).

A.6.2 Η φωσφατάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PPM2C, PDP1)

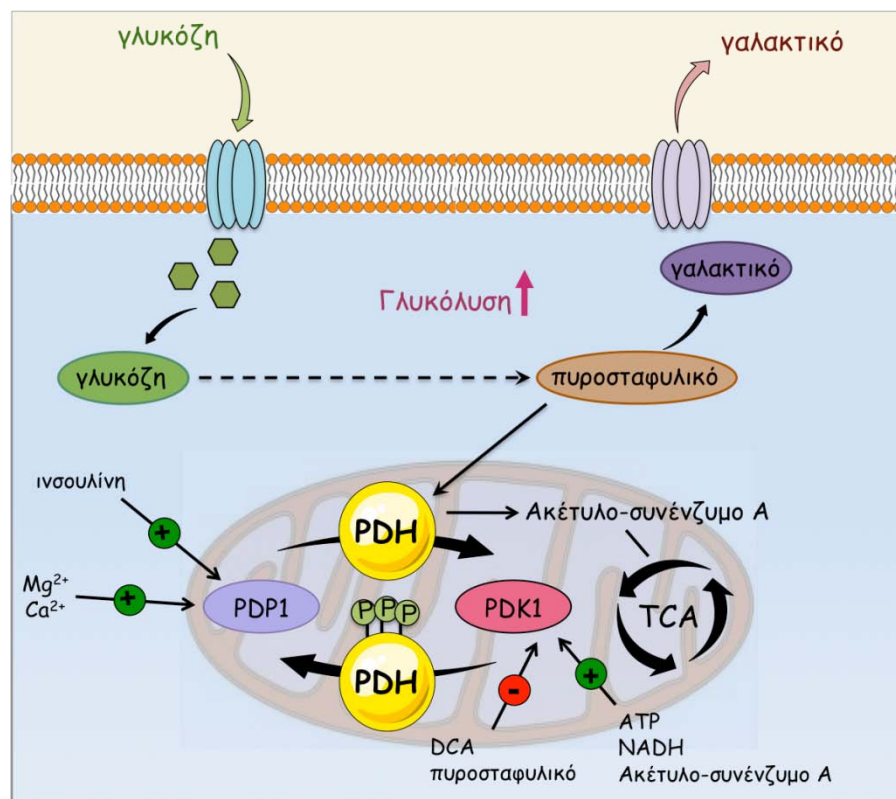
Η φωσφατάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού PDP1, ανήκει στην κατηγορία των φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης και η δράση της είναι εξαρτώμενη από το Mg^{2+} και το Ca^{2+} . Είναι μιτοχονδριακό ένζυμο μεγέθους ~50 kDa, και διαθέτει μόνο ένα γνωστό υπόστρωμα και έναν πολύ συγκεκριμένο ρόλο, που είναι η ρύθμιση της λειτουργίας του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, PDC (Εικόνα 20).

Το PDC αποτελεί κομβικό σημείο του μεταβολισμού και καταλύει τη μη-αντιστρεπτή οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-συνένζυμο Α, συνδέοντας τη γλυκόλυση με τον κύκλο του Krebs. Το ακέτυλο-συνένζυμο Α που παράγεται από το PDC χρησιμοποιείται επίσης και για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων σε ορισμένους ιστούς (185). Παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιοστασίας της γλυκόζης, καθώς σε περιπτώσεις στέρησης τροφής η έλλειψη γλυκόζης αναστέλλει τη δράση του συμπλόκου.

Το PDC αποτελείται από τρία καταλυτικά συστατικά, ένα συστατικό δέσμευσης και δύο ρυθμιστικά συστατικά. Τα καταλυτικά συστατικά είναι το E1, η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (PDHA1), το E2 (ακετυλοτρανσφεράση του διϋδρολιποαμιδίου) και το E3 (αφυδρογονάση του διϋδρολιποαμιδίου). Επίσης η υπομονάδα E3BP (E3 binding protein) και τα ένζυμα PDHK ή PDK (κινάση της PDH) και PDP (φωσφατάση της PDH) (185, 186). Η λειτουργία του συμπλόκου καθορίζεται από επαναλαμβανόμενους κύκλους μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων (φωσφορυλίωσης / αποφωσφορυλίωσης) της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού PDH από τα ρυθμιστικά συστατικά του συμπλόκου (PDK/PDP), οι οποίοι ελέγχονται α) ιστό-ειδικά από τη διαθεσιμότητα των αντίστοιχων ενζύμων (ισομορφές

των ενζύμων), β) από τη ρύθμιση της δράσης των PDK και PDP και γ) από τα επίπεδα των μεταβολιτών, την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και τη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων (187, 188).

Η PDH φωσφορυλιώνεται από την PDK σε τρία κατάλοιπα σερίνης (Ser264/Ser271/Ser293), με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της. Στην περίπτωση αυτή το PDC καθίσταται ανενεργό και ο μεταβολισμός στρέφεται προς την αναερόβια γλυκόλυση και τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ. Η PDP αντιστρέφει την τροποποίηση αυτή, αποφωσφορυλιώνει την PDH και επανενεργοποιεί το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού. Η επαναφορά της λειτουργίας του PDC οδηγεί σε παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια. Τόσο η PDK όσο και η PDP προσδένονται στις λιποϋλ-ομάδες του E2, που αποτελεί τον πυρήνα του συμπλόκου, προκειμένου να ασκήσουν τη δράση τους πάνω στο E1 συστατικό (PDH).



Εικόνα 20: Ο μηχανισμός ρύθμισης της δράσης του συμπλόκου PDC. Η φωσφορυλίωση της PDH από την PDK οδηγεί σε απενεργοποίηση του PDC και ενεργοποίηση της γλυκόλυσης. Η ενεργοποίηση του PDC μέσω της αποφωσφορυλίωσης της PDH από την PDP1, επάγει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε acetyl-CoA και την είσοδό του στον κύκλο του Krebs. Η λειτουργία του PDC ρυθμίζεται επίσης και από τη συγκέντρωση προϊόντων του μεταβολισμού, ιόντα και την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου.

Η υψηλή παραγωγή γαλακτικού οξέος και η μερική οξείδωση της γλυκόζης, εκτός από τις συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, εμφανίζεται σε καρκινικά κύτταρα και όγκους. Αυτός ο τροποποιημένος μεταβολικός φαινότυπος είναι γνωστός ως φαινόμενο Warburg, και έχει συνδεθεί με την κακοήγη εξέλιξη των όγκων και την κακή εξέλιξη της νόσου. Η αναστολή της δράσης του PDC από τη δράση της PDK, έχει ως αποτέλεσμα να εμφανίζεται ο φαινότυπος Warburg.

Έχουν χαρακτηριστεί δύο ισομορφές της φωσφατάσης PDP, η PDP1 που είναι διμερές αποτελούμενο από μια καταλυτική και μια ρυθμιστική υπομονάδα, και η PDP2 (189). Η καταλυτική υπομονάδα της PDP1 μπορεί να εκδηλώσει τη δράση φωσφατάσης απουσία της ρυθμιστικής υπομονάδας (190). Η PDP1 ανιχνεύτηκε κυρίως στην καρδιά και τον εγκέφαλο, ενώ η PDP2 στο ήπαρ, τα νεφρά, τη καρδιά και τον εγκέφαλο. Και οι δύο ισομορφές της φωσφατάσης μπορούν να αποφωσφορυλιώσουν και τα τρία κατάλοιπα σερίνης της PDH, όμως η PDP1 εμφανίζει ισχυρότερη καταλυτική δράση σε σχέση με την PDP2 (191, 192).

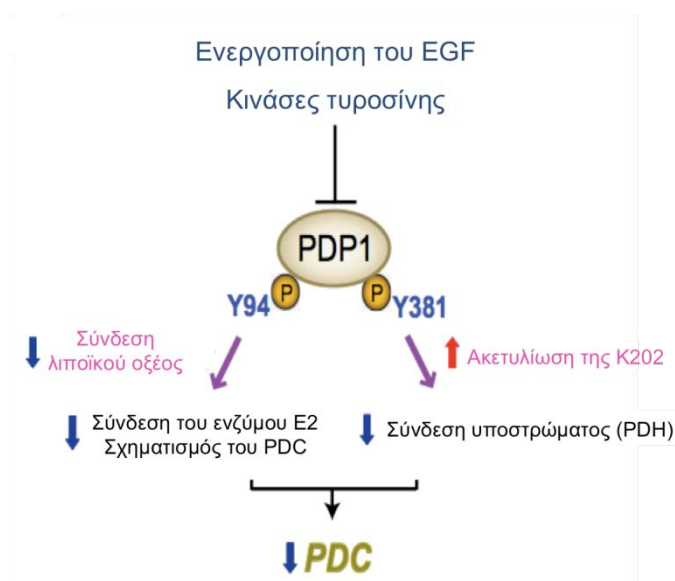
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η δράση της PDP ελέγχεται από τα επίπεδα ασβεστίου. Η PDP1 προσδένεται στην περιοχή L2 του ενζύμου E2 με τη συμμετοχή του Ca^{2+} (193). Αντίθετα η PDP2 δεν εμφανίζει ευαισθησία στο ασβέστιο. Η αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} στο κύτταρο, επάγει τη δράση της PDP1 (192).

Επιπλέον, η PDP θεωρείται εξαρτώμενη από το Mg^{2+} , καθώς στο ενεργό της κέντρο φέρει θέση σύνδεσης μετάλλου. Οι PDP1 και PDP2 έχουν διαφορετική ευαισθησία για το Mg^{2+} . Η ρυθμιστική υπομονάδα αυξάνει τη συγκέντρωση μαγνησίου που είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της καταλυτικής δράσης φωσφατάσης. Η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες μειώνουν τη σταθερά Km για το Mg^{2+} , πιθανόν επειδή ανταγωνίζονται για την πρόσδεση στη ρυθμιστική υπομονάδα της PDP (185, 187).

Ακόμη, η δράση της PDP έχει δείχθει ότι ρυθμίζεται και από την ινσουλίνη. Η ινσουλίνη αυξάνει τη δράση της PDP, μέσω της PKCδ (protein kinase Cδ), η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη φωσφατάση (194, 195). Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ινσουλίνη επηρεάζει τη δράση της PDP μέσω των μονοπατιών PI3K/Akt και MAPK (196).

Τέλος, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν τη ρύθμιση της δράσης της PDP1 μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων. Στην υποξία που το μονοπάτι τον κινασών τυροσίνης είναι ενεργοποιημένο, η PDP1 φωσφορυλιώνεται σε δύο κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr94 και Tyr381) με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δράση της, μέσω διαφορετικού μηχανισμού σε κάθε περίπτωση (Εικόνα 21). Συγκεκριμένα η φωσφορυλίωση της Tyr94 μειώνει την ικανότητα δέσμευσης της PDP1 στο λιποϊκό οξύ της L2 περιοχής του E2 (197). Η φωσφορυλίωση της Tyr381 από την άλλη, προκαλεί την αποσύνδεση της απακετυλάσης SIRT3 (Sirtuin 3) και

προωθεί τη σύνδεση της ακετυλοτρανσφεράσης ACAT1 (Acetyl-CoA acetyltransferase ή Acetyl-CoA thiolase) στο PDC, οδηγώντας σε αύξηση της ανασταλτικής ακετυλίωσης των PDH και PDP1 σε κατάλοιπα λυσίνης (198).



Εικόνα 21: Η αρνητική ρύθμιση της δράσης της PDP1 από τη φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση της PDP από κινάσες τυροσίνης σε δύο διαφορετικά κατάλοιπα τυροσίνης, οδηγεί σε αναστολή της δράσης της φωσφατάσης μέσω δύο διακριτών μηχανισμών, οδηγώντας σε απενεργοποίηση του PDC και στροφή προς τον αναερόβιο μεταβολισμό (197), τροποποιημένη.

Παρατηρήθηκε ότι μεταλλάξεις του γονιδίου φωσφατάσης σε δύο ασθενείς, με αποτέλεσμα τη μη ενεργοποίηση της PDP1, συνδέονται με ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από υποτονία, διατροφικές δυσκολίες, αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος και καθυστερημένη ψυχοκινητική ανάπτυξη (199).

Όσον αφορά την PDK, υπάρχουν 4 ισομορφές της κινάσης, PDK1, PDK2, PDK3 και PDK4, που παρουσιάζουν ιστό-ειδικότητα (187). Εμφανίζουν υψηλή ομολογία μεταξύ τους (66% -74%), ενώ είναι αρκετά συντηρημένες και μεταξύ των ειδών. Διαφέρουν όμως μεταξύ τους ως προς τις κινητικές παραμέτρους, τη ρύθμιση από τους μεταβολίτες, τη σχετική καταλυτική τους ενεργότητα και την εξειδίκευση στη φωσφορυλίωση των τριών θέσεων-στόχων της PDH (200). Παρόλο που όλες οι ισομορφές φωσφορυλιώνουν τις θέσεις 1 και 2, η θέση 3 φωσφορυλιώνεται μόνο από την PDK1 (191, 201).

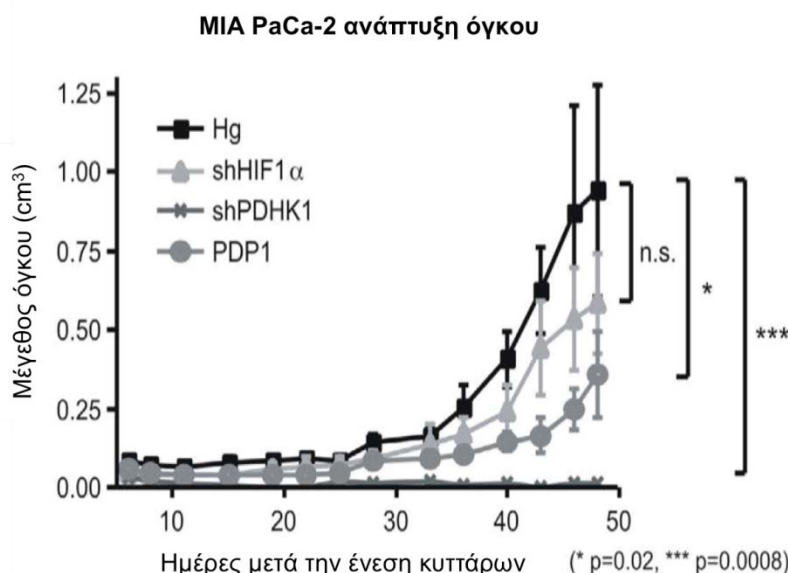
Η PDK ρυθμίζεται από διάφορα προϊόντα του μεταβολισμού. Η αύξηση της αναλογία NADH^+/NAD και $\text{acetyl-CoA}/\text{CoA}$ ρυθμίζει θετικά την PDK, οδηγώντας σε απενεργοποίηση του PDC. Από την άλλη, η συσσώρευση και αύξηση της συγκέντρωσης του πυροσταφυλικού, προκαλεί την αναστολή της δράσης της PDK και την ενεργοποίηση της PDH. Έχει ακόμη

δειχθεί, ότι το διχλωροξικό (DCA), που είναι ανάλογο του πυροσταφυλικού, επίσης αναστέλλει τη δράση της PDK1 και οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη του όγκου, σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε ζώα (202) και σε ένα μικρό δείγμα ασθενών (203), μέσω της ενεργοποίησης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της αντιστροφής του φαινομένου Warburg και της ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων στην απόπτωση.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η PDK1 ρυθμίζεται και από τη φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση της PDK1 σε κατάλοιπα τυροσίνης, ως απόκριση στη σηματοδότηση από αυξητικούς παράγοντες, οδηγεί σε ενεργοποίηση της κίνησης και παρέχει έναν μηχανισμό καταστολής του μιτοχονδριακού PDC στον καρκίνο. Συγκεκριμένα, η PDK1 φωσφορυλιώνεται άμεσα από τον ενεργοποιημένο FGFR1 σε καρκινικά κύτταρα, στα κατάλοιπα Tyr136, Tyr243, Tyr244. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προωθείται το φαινόμενο Warburg στα καρκινικά κύτταρα συντελώντας στην ανάπτυξη του όγκου, όπως παρατηρήθηκε σε *in vivo* πειράματα (204).

Η δράση της PDK1 αυξάνεται επίσης και ως απόκριση στην έλλειψη οξυγόνου. Έχει δειχθεί ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί για την PDK1 αποτελεί μεταγραφικό στόχο αποκλειστικά του HIF-1 και όχι των άλλων ισομορφών HIF (205). Η επαγόμενη από τον HIF-1 έκφραση της PDK1 αποτελεί ένα μεταβολικό διακόπτη, απαραίτητο για την απόκριση των κυττάρων στην υποξία καθώς σταματάει ο κύκλος του Krebs να τροφοδοτείται με το απαραίτητο ακετυλο-συνένζυμο A.

Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, η δράση των PDK1 και PDP1 έχει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ογκογένεσης. Τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* πειράματα η υπερέκφραση της φωσφατάσης οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, μειωμένη ανάπτυξη του όγκου και αυξημένη επιβίωση των ασθενών (206). Η αναστολή της δράσης της PDH ως απόκριση στην υποξία (ενεργοποίηση του HIF-1α και επακόλουθη επαγωγή της PDK1), είναι απαραίτητη για τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού και την ανάπτυξη του όγκου (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Η ανάπτυξη του όγκου μειώνεται όταν η PDH είναι ενεργοποιημένη. Το διάγραμμα δείχνει ότι η αποσιώπηση του HIF-1α, η αποσιώπηση της PDK1 και η υπερέκφραση της PDP1, που καθιστούν το PDC λειτουργικό, μειώνουν σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου σε συνθήκες υποξίας (206), τροποποιημένη.

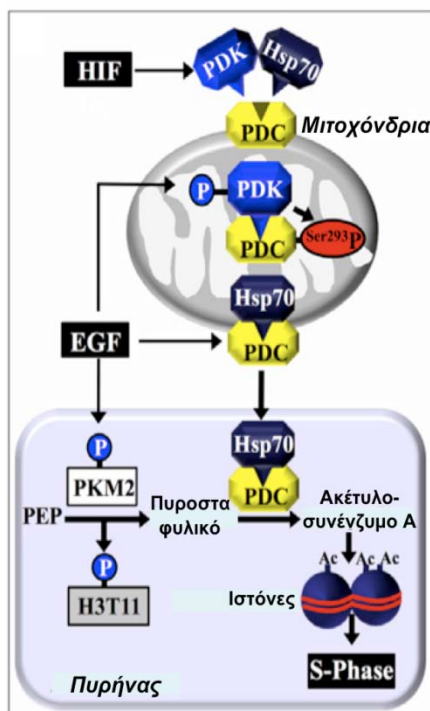
Η απενεργοποίηση του PDC εξασφαλίζει την αναστολή της επαγόμενης από τα μιτοχόνδρια έναρξης της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα (202). Η αναστολή του συμπλόκου στα κύτταρα σχετίζεται με τη σταθεροποίηση του HIF-1α, με την αλλαγή της συγκέντρωσης μεταβολιτών της γλυκόλυσης και την αύξηση των επιπέδων της PDK1. Η αύξηση της συγκέντρωσης των μεταβολιτών της γλυκόλυσης, ως αποτέλεσμα της υψηλής έκφρασης της PDK1, οδηγεί στη συνέχεια σε ενεργοποίηση του HIF-1α, σχηματίζοντας έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης και την πρόοδο της κακοήθειας.

Έχει δειχθεί ότι η αποσιώπηση της PDK1, μειώνει τη φωσφορυλίωση της PDH (χωρίς να την εξαλείφει), επαναφέρει τη λειτουργία του συμπλόκου, αντιστρέφει το μεταβολικό φαινότυπο Warburg και οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του HIF-1α (στη νορμοξία), με τελικό αποτέλεσμα τη μειωμένη επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και τη μείωση ανάπτυξης του όγκου (206) (Εικόνα 22).

Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε υποξικές συνθήκες, και ότι η απορρύθμιση του συμβάλει σημαντικά στην ογκογένεση.

Μια ερευνητική ομάδα υποστήριξε πρόσφατα ότι το σύμπλοκο PDC μεταφέρεται με τη βοήθεια μοριακών συνοδών από το μιτοχόνδριο μέσα στον πυρήνα. Εκεί, παράγει ακέτυλο-συνένζυμο A, το οποίο χρησιμοποιείται για την ακετυλίωση των ιστονών. Η PDK1 δεν εντοπίστηκε στον πυρήνα, γεγονός που υποδεικνύει ότι το σύμπλοκο είναι συνεχώς ενεργό

μέσα στον πυρήνα. Αντίθετα έδειξαν ότι ένα μικρό κλάσμα της PDP1 μετατοπίζεται, επίσης, στον πυρήνα (207) (Εικόνα 23).



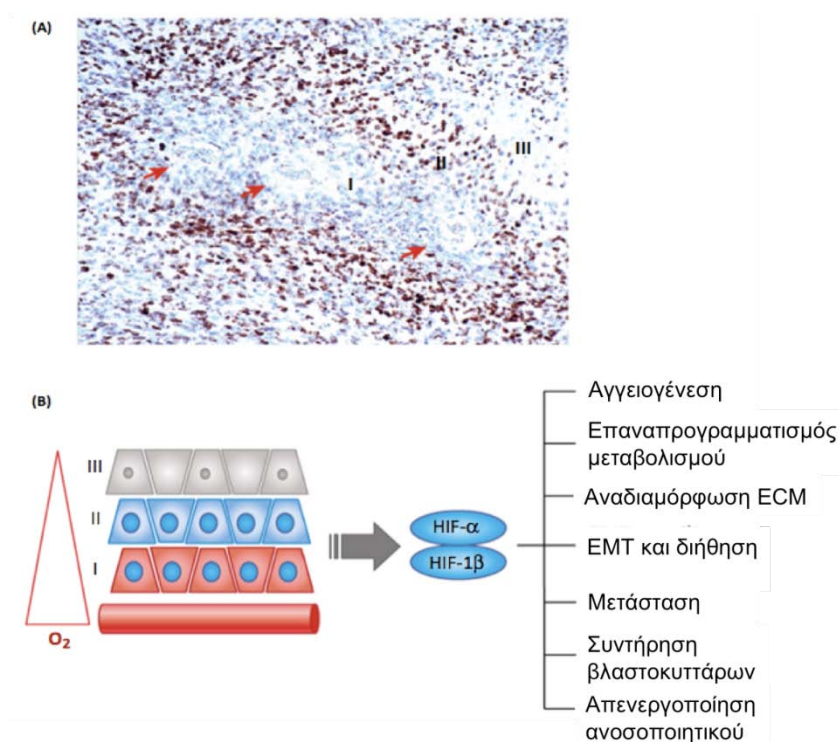
Εικόνα 23: Η μετατόπιση και λειτουργία του PDC στον πυρήνα διαμεσολαβεί την ακετυλίωση των ιστονών. Η σηματοδότηση από τον EGF οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της Hsp70, η οποία διαμεσολαβεί τη μεταφορά του PDC και της PKM2 στον πυρήνα. Η Hsp70 ανταγωνίζεται με την PDK1 για τη σύνδεση στο PDC, διασφαλίζοντας έτσι τη συνεχή λειτουργικότητα του συμπλόκου μέσα στον πυρήνα. Η PKM2 διαμεσολαβεί την παραγωγή πυροσταφυλικού μέσα στον πυρήνα, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε ακετυλο-συνένζυμο Α από το PDC. Το ακετυλο-συνένζυμο Α χρησιμοποιείται για την ακετυλίωση των ιστονών, γεγονός που διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (207), τροποποιημένη.

A.7 Σχέση υποξίας, HIF-1α και καρκίνου

Η υποξία είναι μια κατάσταση που συνήθως παρατηρείται σε στερεούς όγκους σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης τους. Τέτοιου είδους μορφώματα χωρίζονται σε τρεις διακριτές ζώνες σύμφωνα με την ύπαρξη αγγείωσης και τη συγκέντρωση οξυγόνου. Η ζώνη I αποτελείται από καλά οξυγονωμένα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται σε επαφή με τα αιμοφόρα αγγεία. Η ζώνη III είναι μια νεκρωτική περιοχή, όπου τα καρκινικά κύτταρα έχουν πεθάνει από ασφυξία, καθώς λόγω του αυξημένου πολλαπλασιασμού βρίσκονται απομακρυσμένα σε μεγάλη απόσταση από τα αγγεία, με αποτέλεσμα η παροχή οξυγόνου να είναι σχεδόν ανύπαρκτη και η διαθέσιμη συγκέντρωση οξυγόνου ανεπαρκής για την επιβίωση των κυττάρων αυτών. Η ζώνη II συνίσταται από κύτταρα που επιβιώνουν σε ελαττωμένη

συγκέντρωση οξυγόνου και τα οποία είναι και αυτά που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κακοήθεια του καρκίνου (208) (Εικόνα 24Α).

Όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, οι HIF-α σταθεροποιούνται και επάγουν την εξαρτώμενη από τους HIF μεταγραφική ενεργοποίηση. Εκτός από την έλλειψη οξυγόνου, οι HIF επάγονται εξαιτίας της αύξησης συγκεκριμένων μεταβολιτών (όπως το ηλεκτρικό και το φουμαρικό) και της όξυνσης του περιβάλλοντος των κυττάρων (82, 209, 210). Οι HIF ως κύριοι διαμεσολαβητές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία, ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται σε βασικές πτυχές της βιολογίας του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του επαναπρογραμματισμού του μεταβολισμού της γλυκόζης, της αύξησης του πολλαπλασιασμού, της ανθεκτικότητας στην απόπτωση, της αγγειογένεσης, της μετάστασης, της συντήρησης των βλαστικών κυττάρων, της μείωσης της δράσης του ανοσοποιητικού και της ανθεκτικότητας στην χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία (211) (Εικόνα 24Β). Με τον τρόπο αυτό οι HIF εξασφαλίζουν όχι μόνο την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην ανάπτυξη του υποξικού μικροπεριβάλλοντος, αλλά είναι υπεύθυνοι και για την προώθηση της ογκογένεσης (3, 211, 212).



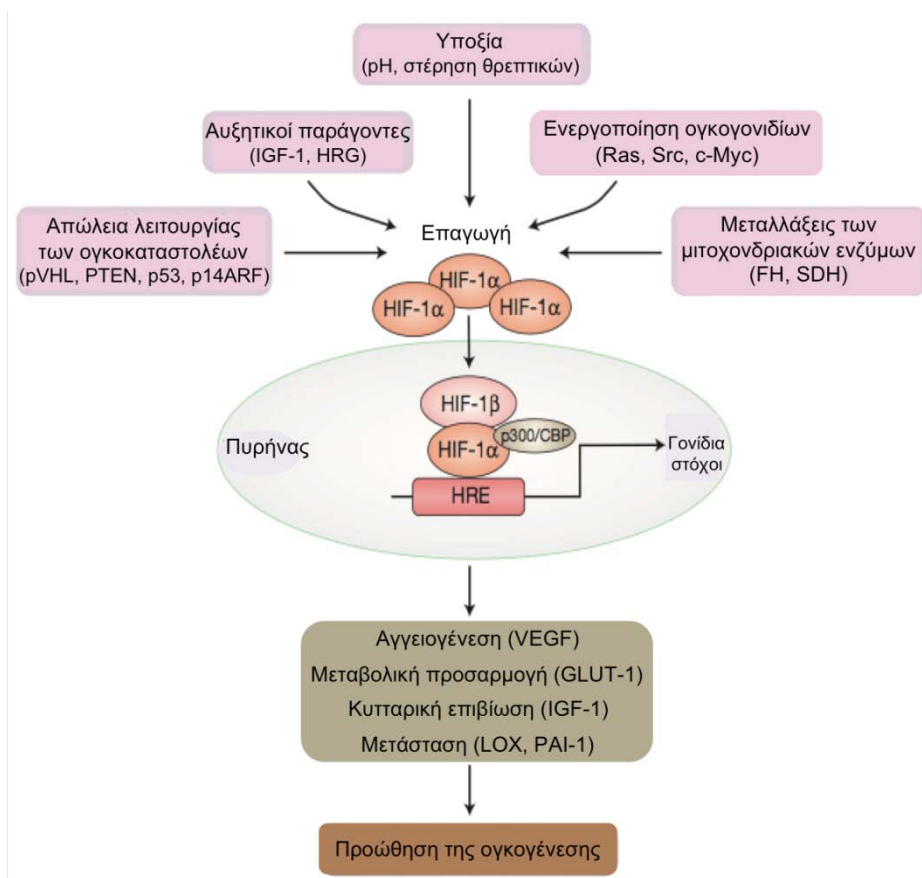
Εικόνα 24: Η υποξία επάγει την εξαρτώμενη από τους HIF ανάπτυξη του όγκου. Α) Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του HIF-1α σε βιοψία καρκίνου. Στην τομή αναγνωρίζονται η ζώνη I με τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στα αγγεία, η ζώνη II που χαρακτηρίζεται από την έκφραση του HIF-1α και η ζώνη III που αποτελείται από νεκρωτικά κύτταρα, Β) Τα κύτταρα της ζώνης II λόγω της χαμηλής οξυγόνωσης εκφράζουν υψηλά επίπεδα

των παραγόντων HIF, οι οποίοι επάγουν την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων που διαμεσολαβούν όλες τις βασικές διεργασίες που ευνοούν την πρόοδο του καρκίνου (208), τροποποιημένη.

Πέρα από την υποξία, η επαγωγή του HIF-1α έχει συσχετιστεί και με την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που έχειδειχθεί ότι ευνοούν την αυξημένη επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (211). Όπως ήδη αναφέρθηκε, κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες οδηγούν στην ενεργοποίηση του HIF-1α (Εικόνα 25), ο οποίος με τη σειρά του επάγει την έκκριση από τα καρκινικά κύτταρα σηματοδοτικών μορίων, που προωθούν την ογκογένεση (1), σχηματίζοντας έτσι έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης του HIF-1 μονοπατιού.

Επίσης, ο HIF-1α ενεργοποιείται και από γενετικές αλλαγές οι οποίες προκαλούν κυρίως απώλεια της λειτουργίας γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι του HIF (Εικόνα 25). Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στο γονίδιο του pVHL που έχουν ως αποτέλεσμα την απενεργοποίησή του, έχειδειχθεί ότι αυξάνουν την έκφραση του HIF-1α, εξαιτίας της αναστολής της ουβικιτινίωσης και της αποικοδόμησής του (213). Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH) και της φουμαράσης (FH) οδηγούν σε αναστολή της δράσης των PHD, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α και την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του σε διάφορα είδη καρκίνων (214, 215).

Η απορρύθμιση σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Εικόνα 25), συμβάλλει και αυτή στην υπερέκφραση του HIF-1α στον καρκίνο. Σε καρκινικά κύτταρα στα οποία είναι συνεχώς ενεργά τα μονοπάτια των Ras/MAPK, Src και PI3K/Akt/mTOR, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α (216-219). Ακόμη, η απώλεια της λειτουργίας ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όπως του PTEN και της p53, η οποία οδηγεί σε συνεχή ενεργότητα του Akt μονοπατιού, σχετίζεται με αυξημένη ενεργότητα του HIF-1 (220, 221).



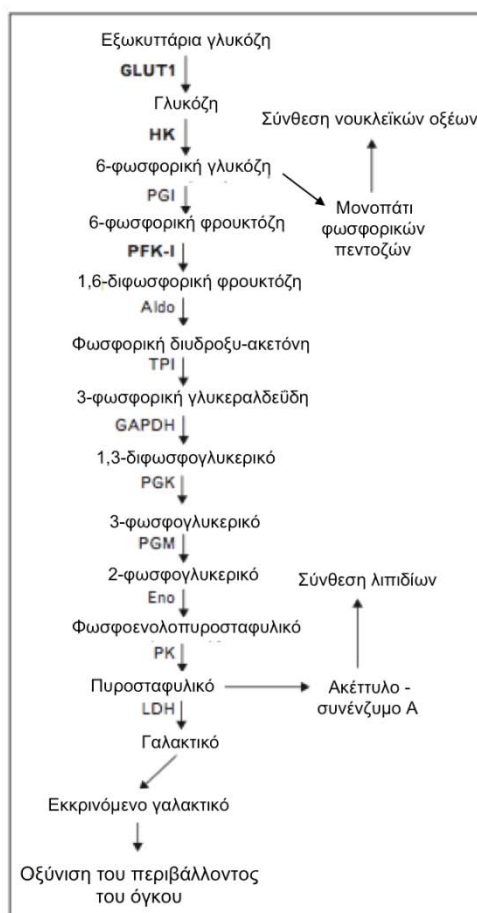
Εικόνα 25: Μονοπάτια ενεργοποίησης του HIF-1 στον καρκίνο. Ο επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α στα καρκινικά κύτταρα πραγματοποιείται εξαιτίας αλλαγών στις συνθήκες του περιβάλλοντος (όπως είναι η υποξία, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, η μείωση του pH), της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών (όπως αυτά του Ras, Src και Myc) και αυξητικών παραγόντων, της απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών και των μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά ένζυμα. Η υπερέκφραση του HIF-1α καταλήγει στην επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση, τη μεταβολική προσαρμογή, τη μετάσταση, προσφέροντας πλεονέκτημα για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (222), τροποποιημένη.

Ο HIF-1α έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου όπως της ουροδόχου κύστης, του εγκεφάλου, του στήθους, του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου, των ωοθηκών, του πνεύμονα, του παγκρέατος, του στομάχου και του ορθού (211). Τα αυξημένα επίπεδα του HIF-1α σε διαγνωστικές βιοψίες πολλών τύπων καρκίνου έχουν συσχετιστεί με κακοήγη φαινότυπο, αυξημένη επιθετικότητα, κακή πρόγνωση, υψηλή μεταστατικότητα και αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας των ασθενών (35, 208, 222). Αυτά τα αποτελέσματα συμπληρώνονται κι από πειραματικές μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν ότι οι γενετικοί χειρισμοί που αυξάνουν την έκφραση του HIF-1α, έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη ανάπτυξη των όγκων, ενώ αντίθετα η απώλεια της ενεργότητας του HIF-1 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης των όγκων (223).

Η υπερέκφραση του HIF-1α και η απορρύθμιση της δράσης του HIF-1, προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα πλεονέκτημα επιβίωσης στο υποξικό μικροπεριβάλλον που αναπτύσσεται στην περιοχή του όγκου, ρυθμίζοντας κατά κύριο λόγο το μεταβολισμό τους και επάγοντας την δημιουργία νέων αγγείων (224). Η μεταβολική προσαρμογή που διαμεσολαβείται από τον HIF-1 εξυπηρετεί την οξειδοαναγωγική ομοιοστασία (208). Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο Α.2.2 για τα φυσιολογικά κύτταρα, έτσι και στα καρκινικά κύτταρα ο HIF-1α επάγει την έκφραση των μεταφορέων της γλυκόζης (*GLUT1* και *GLUT3*) και σχεδόν όλων των γλυκολυτικών ενζύμων, στρέφοντας το μεταβολισμού προς την αναερόβια γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας (Εικόνα 26).

Παράλληλα, ο HIF-1 επηρεάζει και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων με πολλούς τρόπους (208). Έχει δειχθεί ότι επάγει τη μεταγραφή της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDK1) (205), που όπως αναφέρθηκε προηγουμένως αναστέλλει τη λειτουργία του μιτοχονδριακού συμπλόκου PDC και οδηγεί στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Επιπλέον, ο HIF-1 μειώνει την παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια, επάγοντας την έκφραση μιας πιο αποδοτικής ισομορφής της οξειδάσης του κυτοχρώματος (225, 226). Ακόμη, ο HIF-1 επάγει τη μιτοφαγία (αυτοφαγία των μιτοχονδρίων), αυξάνοντας την έκφραση των BNIP3 και BNIP3L, μελών της οικογένειας BCL2, οι οποίες διαμεσολαβούν την απομάκρυνση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων, συμβάλλοντας έτσι στην κυτταρική επιβίωση (212).

Ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την PKM2 (pyruvate kinase M2), η οποία λειτουργεί ως συνενεργοποιητής, προκειμένου να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων όπως *GLUT1* (μεταφορέας της γλυκόζης 1), *LDHA* (αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού Α), *PDK1* (Εικόνα 26) (96). Ο HIF-1 διεγείρει επίσης την αποθήκευση της γλυκόζης ως γλυκογόνο, ενεργοποιώντας ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση γλυκογόνου (227, 228). Επιπλέον, ρυθμίζει το ενδοκυττάριο pH, αυξάνοντας την παραγωγή γαλακτικού και την εκροή πρωτονίων, επάγοντας την έκφραση του μεταφορέα μονοκαρβοξυλίων (MCT4), της καρβονικής ανυδράσης 9 (CAIX) και του καναλιού ιόντων $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (229).



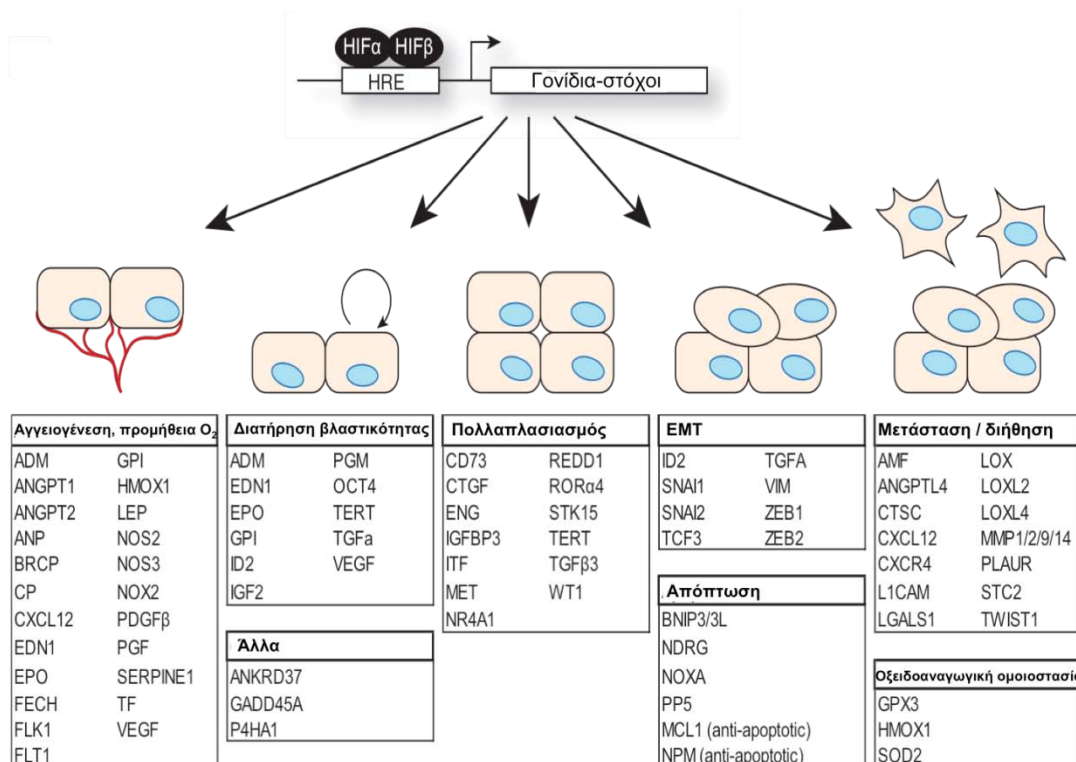
Εικόνα 26: Ο φαινότυπος Warburg στα καρκινικά κύτταρα. Η στροφή του μεταβολισμού προς την αναερόβια γλυκόλυση παρατηρείται συχνά στα καρκινικά κύτταρα και οφείλεται στην ενεργοποίηση ενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η αυξημένη κατανάλωση της γλυκόζης μέσω του μονοπατιού της γλυκόλυσης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων, τα οποία το κύτταρο χρειάζεται για τη διασφάλιση του γρήγορου πολλαπλασιασμού (σύνθεση νουκλεϊκού οξέος, αντιγραφή του DNA). Η αυξημένη παραγωγή πυροσταφυλικού διεγείρει την σύνθεση λιπιδίων. Τελικά, η έκκριση γαλακτικού από τα κύτταρα του όγκου, επάγει την όξυνση του περιβάλλοντος και την ανάπτυξη του όγκου. Aldo: αλδολάση, Eno: ενολάση, GAPDH: 3-φωσφορική αφυδρογονάση της γλυκεραλδεϋδης, GLUT1: μεταφορέας της γλυκόζης 1, HK: εξοκινάση, LDH: γαλακτική αφυδρογονάση, PFK-I: φωσφο-φρουκτοκινάση 1, PGI: ισομεράση της φωσφογλυκόζης, PGK: κινάση του φωσφογλυκερικού, PGM: μουτάση του φωσφογλυκερικού, PK: κινάση του πυροσταφυλικού, TPI: ισομεράση της φωσφορικής τριόζης (230), τροποποιημένη.

Πρόσφατα δεδομένα εμπλέκουν την υποξία και τον HIF στον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των λιπιδίων. Αν και τα καρκινικά κύτταρα προμηθεύονται τα απαραίτητα λιπαρά οξέα αυξάνοντας την πρόσληψη τους μέσω της επαγωγής γονιδίων όπως τα *FABP3/7* (Πρωτεΐνες δέσμησης λιπαρών οξέων 3/7) (231, 232), σε ορισμένες καρκινικές σειρές παρατηρείται και αυξημένη έκφραση της συνθάσης των λιπαρών οξέων (*FASN*) μέσω του HIF-1 (233). Επιπροσθέτως, η έλλειψη οξυγόνου και ακόλουθη δυσλειτουργία των

μιτοχονδρίων αυξάνει την συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων λόγω αναστολής της β-οξειδωσης (234). Η υπέρμετρη όμως συσσώρευση λιπαρών οξέων σε συνθήκες υποξίας μπορεί να οδηγήσει σε λιποτοξικότητα και κυτταρικό θάνατο (235). Έτσι, τα κύτταρα για να επιζήσουν εστεροποιούν τα λιπαρά οξέα σε τριακυλογλυκερόλες που συσσωρεύονται σε σταγονίδια λίπους. Όντως, σε συνθήκες υποξίας υπάρχει σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση λιποσταγονιδίων (236). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην εξαρτώμενη από τον HIF-1 επαγωγή των γονιδίων του βιοσυνθετικού μονοπατιού των τριακυλογλυκερολών, *AGPAT2* και της *LPIN1*, τα οποία κωδικοποιούν για τα ένζυμα της ακυλοτρανσφεράση της 1-ακυλο 3-φωσφορικής γλυκερόλης και της φωσφατάσης του φωσφατιδικού οξέος λιπίνη 1 αντίστοιχα (Εικόνα 4, παράγραφος A.2.2) (236, 237). Σημαντική είναι και η ρύθμιση της α-υπομονάδας του HIF-1 από την κινάση CK1δ, καθώς η φωσφορυλίωση από την CK1 στη σερίνη 247 του HIF-1α ελαττώνει τη δράση του με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση της λιπίνης 1, τον περιορισμό των λιποσταγονιδίων και τη μείωση, της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 4, παράγραφος A.2.2) (122).

Όσον αφορά την αγγειογένεση, πρόκειται για μια διαδικασία σχηματισμού νέων μικρών τριχοειδών από τα προϋπάρχοντα αγγεία, με σκοπό την αύξηση της μεταφοράς οξυγόνου για την υποστήριξη της ανάπτυξης του όγκου. Στην κατεύθυνση αυτή, ο HIF-1 επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που διαμεσολαβούν την αγγειογένεση, όπως των αυξητικών παραγόντων *VEGF*, *SDF-1*, *PGF*, *ANGPT2* και ενζύμων όπως η συνθάση του NO (223) (Εικόνα 5, παράγραφος A.2.2). Η φυσιολογική αγγειογένεση δημιουργεί λειτουργικά αγγεία μέσω της οργανωμένης έκφρασης πολλαπλών αγγειογενετικών παραγόντων για την αύξηση της αιμάτωσης, ενώ η αγγειογένεση στους όγκους παράγει αγγεία τα οποία είναι δομικά και λειτουργικά ανώμαλα εξαιτίας της μη κατάλληλης ισορροπίας και της υπερβολικής παραγωγής των αγγειογενετικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του όγκου (238).

Επιπλέον, ο HIF-1 επάγει τη μετάσταση, μέσω της μεταγραφής παραγόντων που διασφαλίζουν την επιτυχή διεκπεραίωση των διαφόρων σταδίων της διαδικασίας: τη μετατροπή των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT), τη διείσδυση στον γειτονικό ιστό και την είσοδο στα αιμοφόρα ή τα λεμφικά αγγεία, την έξοδο από τα αγγεία στη θέση σχηματισμού της νέας μεταστατικής εστίας, τη μετάβαση των κυττάρων ξανά από το μεσεγχυματικό στον επιθηλιακό φαινότυπο προκειμένου να αποκτήσουν ξανά την ικανότητα κλωνογονικότητας. Παραδείγματα παραγόντων που επάγονται από τον HIF-1 και εμπλέκονται στις παραπάνω διεργασίες είναι μέλη της οικογένειας των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP), οι προλυλ-υδροξυλάσες του κολλαγόνου (P4HA1/2), οι λυσουλ-οξειδάσες (LOX-1/ -2/ -4) (Εικόνα 27) (239-243).



Εικόνα 27: Τα γονίδια-στόχοι της υποξίας και οι κυτταρικές λειτουργίες που επηρεάζουν. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 100 γονίδια που αποτελούν άμεσους μεταγραφικούς στόχους των HIF. Οι HIF ενεργοποιούν τόσο κοινά όσο και διακριτά γονίδια, τα οποία συμμετέχουν σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, διαμεσολαβούν τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού, την προ μήθεια οξυγόνου στα κύτταρα, καθώς και διαδικασίες όπως η προστασία από την απόπτωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η μετάσταση (4), τροποποιημένη.

Ακόμη, η έκθεση των καρκινικών κυτταρικών στην υποξία έχει δείχθει ότι επάγει την εξαρτώμενη από τους HIF έκφραση των γονιδίων *KLF4*, *MYC*, *OCT4*, *SOX2* και *NANOG*, τα οποία είναι γνωστό ότι προάγουν την πολυδυναμικότητα και καταστέλλουν τη διαφοροποίηση (Εικόνα 27) (244).

Τέλος, ο HIF-1 επάγει παράγοντες που εμπλέκονται στην αναστολή της απόπτωσης και τον αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού (Εικόνα 27) και προσδίδει στα υποξικά καρκινικά κύτταρα ανθεκτικότητα στην ακτινοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία (245, 246). Η ίδια η κυτταροτοξική χημειοθεραπεία επάγει την εξαρτώμενη από τους HIF μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης με ανεξάρτητο του οξυγόνου τρόπο (247, 248), και προάγει τη διατήρηση του βλαστικού φαινοτύπου στον καρκίνου του στήθους (208).

Έτσι, το υποξικό μικροπεριβάλλον των όγκων προωθεί της ανάπτυξης των καρκινικών όγκων, μέσω της επαγωγής της δράσης του HIF-1.

A.8 Θεραπευτική στόχευση του μονοπατιού υποξίας-HIF-1

Σύμφωνα με τα όσα έχουν αναφερθεί στην παράγραφο A.2.2, οι HIF είναι απαραίτητοι για την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Μάλιστα, σε καταστάσεις όπως οι ισχαιμίες που απαιτούν την αύξηση της διαθεσιμότητας οξυγόνου στα κύτταρα, οι HIF συμβάλλουν θετικά, μέσω της επαγωγής της ερυθροποίησης και της δημιουργίας νέων αγγείων. Για το λόγο αυτό, στόχος των θεραπευτικών προσεγγίσεων σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η ενεργοποίηση των παραγόντων αυτών. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις στις οποίες οι HIF διαδραματίζουν αρνητικό ρόλο, όπως είναι στην περίπτωση του καρκίνου (παράγραφος A.7), όπου ανάμεσα στις στρατηγικές αντιμετώπισης της νόσου περιλαμβάνεται η αναστολή των παραγόντων HIF.

Πολλά συστατικά των μονοπατιών απόκρισης στην υποξία αποτελούν δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους για τον καρκίνο. Οι HIF, και ειδικά ο HIF-1, αποτελούν ελκυστικούς στόχους για αντικαρκινική θεραπεία, καθώς συμβάλλουν όχι μόνο στη μεταβολική προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας, αλλά είναι επίσης υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση γονιδίων που μεσολαβούν την πρόοδο του καρκίνου και τη μετάσταση, όπως περιγράφηκε παραπάνω (παράγραφος A.7) (208). Έχουν αναφερθεί πολλές ουσίες οι οποίες είτε άμεσα, είτε έμμεσα οδηγούν στην αναστολή των HIF (249) (Πίνακες 3 και 4) και για τις οποίες προκλινικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα, έχουν δείξει ότι εμφανίζουν αντί-καρκινική δράση (250), ειδικά όταν εφαρμόζονται σε συνδυασμό με τις παραδοσιακές χημειοθεραπευτικές και ακτινοθεραπευτικές προσεγγίσεις (222, 251).

Η επικύρωση των HIF-α ως στόχοι για αντικαρκινική θεραπεία, υποστηρίζεται και από μια πρόσφατη μελέτη που περιγράφει τη δοκιμή μιας πρωτότυπης ένωσης που στοχεύει τον διμερισμό μεταξύ HIF-2α και ARNT, σε έναν ασθενή που πάσχει από μεταστατικό νεφρικό καρκίνωμα (ccRCC), με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (252). Ομοίως, το μικρό μόριο (PT2399) που αναστέλλει άμεσα τη δράση του HIF-2α δεσμευόμενο στην PAS-B περιοχή του, εμφανίζει αντικαρκινική δράση σε προκλινικές μελέτες πρωτογενούς και μεταστατικού όγκου στα νεφρά (253).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι εξίσου σημαντική είναι η στόχευση του HIF-1 για την θεραπεία και άλλων ασθενειών πέραν του καρκίνου, όπως η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, η μη αλκοολική ηπατική νόσος, η οφθαλμική νέο-αγγειοποίηση και διάφορα φλεγμονώδη νοσήματα, η παθογένεια των οποίων εμπλέκει την υπέρ-ενεργοποίηση του HIF-1 (254).

A.8.1 Ουσίες που στοχεύουν άμεσα τον HIF-1α

Προκειμένου να στοχευθεί άμεσα ο HIF-1α, έχουν εφαρμοστεί προσεγγίσεις που παρεμποδίζουν την έκφραση και μεταγραφική του ενεργότητα. Κάποιες στρατηγικές βασίζονται στη χρήση ειδικών αντινοσηματικών μορίων RNA, τα οποία αναστέλλοντας την έκφραση και κατ' επέκταση τη δράση του HIF-1α, μειώνουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση του VEGF και την αγγειογένεση (255). Στην κατεύθυνση αυτή έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και μια επικρατούσα αρνητική μορφή του HIF-1α, η οποία προκάλεσε την αναστολή της ογκογένεσης, παρεμποδίζοντας το σχηματισμό λειτουργικού συμπλόκου HIF-1, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται ο μεταβολισμός της γλυκόζης σε καρκινικά κύτταρα παγκρεάτος (256).

Μια άλλη προσέγγιση για την αναστολή της δράσης του HIF-1 είναι η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η χρήση του μικρού μορίου χετομίνη, η οποία στοχεύει τη σύνδεση του HIF-1α με τους συμπαράγοντες της μεταγραφής p300/CBP (πιθανόν συνδεόμενη στην περιοχή C-TAD του HIF-1α), με αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και αναστολή της ογκογένεσης (257). Η αναστολή της αλληλεπίδρασης HIF-1α-p300/CBP, επιτυγχάνεται επίσης με την έκφραση ενός ρετροϊκού πολυπεπτιδίου (258) ή με τη χρήση του αντικαρκινικού παράγοντα YC-1, ο οποίος αναστέλλει τη δράση του HIF-1α και την επαγωγή του VEGF, οδηγώντας σε μείωση της ανάπτυξης του όγκου σε ποντίκια χωρίς λειτουργικό ανοσοποιητικό σύστημα (259-261).

Εκτός από την αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες της μεταγραφής, κάποιες ουσίες παρεμποδίζουν τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT. Μικρά μόρια όπως η ρολιτετρακυκλίνη (NSC-50352) (262) και η ακριφλαβίνη (NSC-13502) (263), παρεμπόδισαν το διμερισμό του HIF-1α με τον ARNT, στοχεύοντας τις περιοχές PAS-A και PAS-B αντίστοιχα. Έτσι προκάλεσαν τη μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του HIF-1 μέσω της παρεμπόδισης σχηματισμού λειτουργικού συμπλόκου.

Τέλος, κάποιες ουσίες στοχεύουν τη σύνδεση του HIF-1α στο DNA. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η ουσία εχινομυκίνη, η οποία δείχθηκε ότι αναστέλλει τη σύνδεση του HIF-1α και ARNT στα HRE και κυρίως σε αυτά που βρίσκονται στον εκκινητή του γονιδίου του VEGF, μειώνοντας έτσι την εξαρτώμενη από τα HRE μεταγραφική ενεργότητα και τα επίπεδα mRNA του VEGF στην υποξία (264).

Οι διάφορες ουσίες που δοκιμάστηκαν για την αναστολή του HIF-1α άμεσα, φαίνονται πιο αναλυτικά στον πίνακα 3.

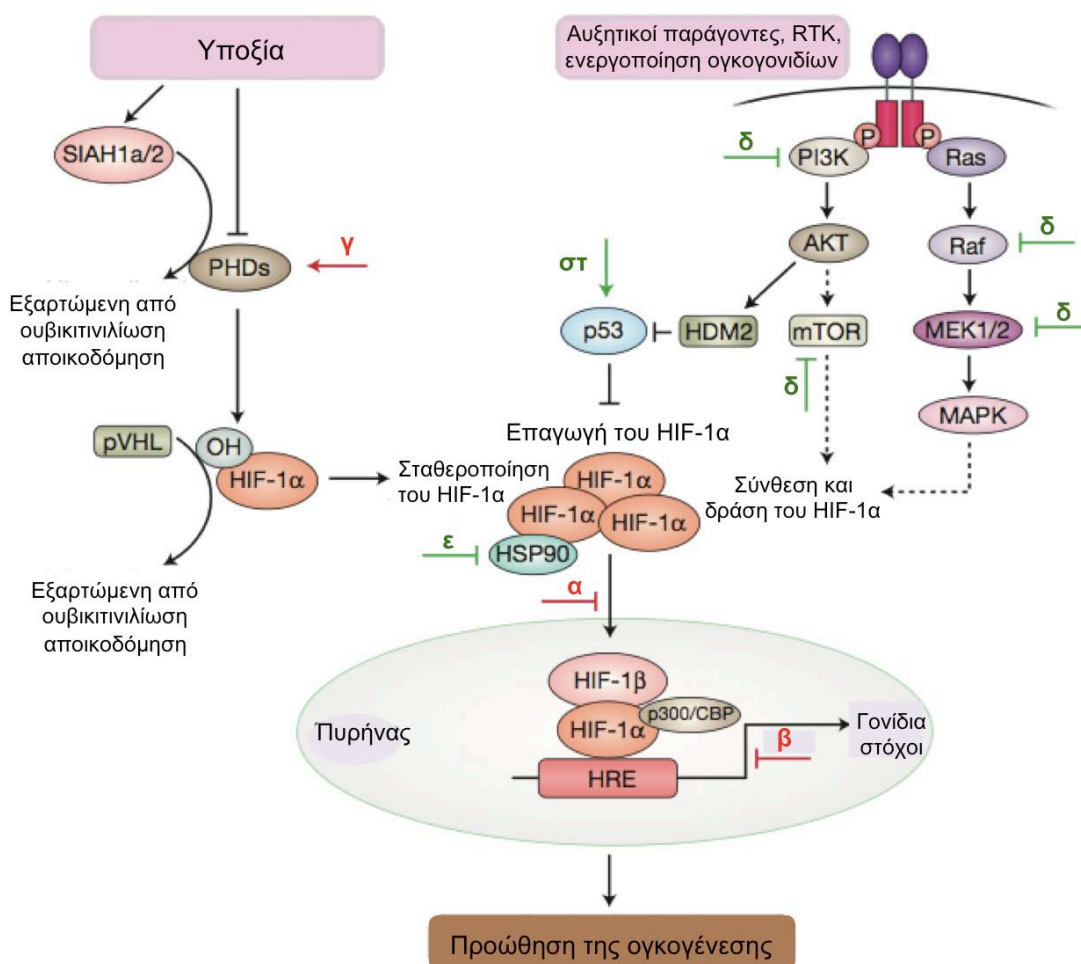
Πίνακας 3: Θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν στην αναστολή του HIF-1α και του μονοπατιού των HIF. Αναγράφονται οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την αναστολή του HIF-1α και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων εκδηλώνουν τη δράση τους (222, 249).

Δοκιμασία	Ουσίες	Μηχανισμός
Βασισμένη στα κύτταρα (HRE αναφορά)	Topotecan (Hycamtin)	Αναστολέας τοποϊσομεράσης 1
	NSC-134754	Αναστολέας μετάφρασης
	103D5R	Αναστολέας μετάφρασης
	Εχινόμυκίνη	Σύνδεση στο DNA
	Alkyliminophenylacetate	DNA/ενεργοποίηση
	Ανθρακυκλίνη	Μιτοχόνδρια
	Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες	Σύνδεση στο DNA
	Καρδιακά γλυκοσίδια	Αναστολείς της πρωτεϊνσύνθεσης του HIF-1α
Επικρατούσα αρνητική μορφή	dnHIF-1	Αναστολή της συγκρότησης λειτουργικού HIF-1
Αντινοσηματικό	SPC-2968 (ENZ-2968)	Αλληλεπίδραση DNA – RNA (αναστολέας έκφρασης)
	RX-0047	Αλληλεπίδραση DNA – RNA (αναστολέας έκφρασης)
Αλληλεπίδραση πρωτεϊνών	Chetomin	Αναστολέας της αλληλεπίδρασης p300–HIF-1α
	Ρολιτετρακυκλίνη	Αναστολέας της αλληλεπίδρασης HIF-1α–HIF-1β (ARNT)
Άλλοι παράγοντες	Ακριφλαβίνη	Αναστολέας της αλληλεπίδρασης HIF-1α–HIF-1β (ARNT)

	KRH102053 HIF oligonucleotide decoy Ενδοσωμάτια (IB-AG2)	Ενεργοποιητής της PHD2 Συνδέεται και απενεργοποιεί τον HIF-1α Αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1
--	--	--

A.8.2 Ουσίες που στοχεύουν σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τους HIF

Οι ουσίες αυτής της κατηγορίας λειτουργούν παρεμποδίζοντας έμμεσα την έκφραση ή τη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1α, καταστέλλοντας τη λειτουργία σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν θετικά τον HIF-1α σε επίπεδο σύνθεσης της πρωτεΐνης, σταθεροποίησης και δράσης (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Στρατηγικές στόχευσης του μονοπατιού του HIF-1 στον καρκίνο. α-γ) Διάφορες στρατηγικές για τη στόχευση της έκφρασης ή της δράσης του HIF-1α, όπως είναι (α) η αναστολή της αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες (π.χ. διμερισμός με τον ARNT ή σύνδεση με τους συμπαραγόντες της μεταγραφής p300/CBP), (β) η αναστολή της εξαρτώμενης από τα HRE μεταγραφικής ενεργότητας, μέσω της χρήσης μικρών μορίων και (γ) η

παρεμπόδιση της σταθεροποίησης, με τη χρήση ενεργοποιητών των PHD και επαγωγή της αποικοδόμησης του HIF-1α. δ-στ) Στόχευση μονοπατιών που είναι γνωστό ότι επάγουν την ενεργοποίηση του HIF-1α (σύνθεση, σταθεροποίηση και δράση) σε καρκινικά κύτταρα, όπως είναι (δ) η αναστολή των μονοπατιών PI3K/Akt/mTOR και Ras/MAPK, (ε) η αναστολή των μοριακών συνοδών (π.χ. Hsp70) και (στ) η ενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών παραγόντων (π.χ. p35) (222), τροποποιημένη.

Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη σταθερότητα του HIF-1α παρέχουν ένα τρόπο για την έμμεση στόχευση των πρωτεϊνικών του επιπέδων σε καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, η ενζυμική δράση των PHD οδηγεί σε αποικοδόμηση του HIF-1α. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί μικρά μόρια, όπως το KRH1020053, που λειτουργούν ως ενεργοποιητές των PHD και προκαλούν τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα (265). Εναλλακτικά, η γενετική απενεργοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη λιγάση ουβικιτίνης Siah1a/2 η οποία ευθύνεται για την ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση της PHD1/3, οδηγεί επίσης σε αποσταθεροποίηση του HIF-1α, και παρέχει ένα μηχανισμό στόχευσης της σταθερότητας του (266, 267).

Ακόμη, έχειδειχθεί ότι η γελδαναμυκίνη (GA) αποτελεί ανταγωνιστή του μοριακού συνοδού Hsp90. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η Hsp90 επάγει τη δράση του HIF-1α, συνεπώς η GA προωθεί την ουβικιτινίωση του HIF-1α και την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα, τόσο σε νορμοξία όσο και σε υποξία, μέσω ενός ανεξάρτητου του pVHL μηχανισμού. Επιπλέον μειώνει δραματικά τη δράση του HIF-1α και τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του (79).

Κάποιες άλλες ουσίες μειώνουν την έκφραση του HIF-1α, αναστέλλοντας μόρια και κινάσες που λειτουργούν ανοδικά σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον HIF-1α. Το φάρμακο 103D5R, μειώνει τη σύνθεση του HIF-1α χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα mRNA και τη σταθεροποίησή του. Έχειδειχθεί ότι το 103D5R αναστέλλει τη φωσφορυλίωση των κινασών Akt, ERK1/2, JNK καθιστώντας τις ανενεργές και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφής γονιδίων στόχων του HIF-1α, όπως του *GLUT1* (268).

Επιπλέον, πρόσφατα αναπτύχθηκε ένα μικρό μόριο, το RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis, επανενεργοποιητής του p53 και επαγωγέας απόπτωσης καρκινικών κυττάρων), που λειτουργεί ως ενεργοποιητής του p53, με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων (269). Παρατηρήθηκε ότι ο παράγοντας αυτός εμποδίζει επίσης την έκφραση του HIF-1α και οδηγεί σε μείωση της μεταγραφής του *VEGF* και της αγγειογένεσης *in vivo*.

Στο κομμάτι αυτό της στόχευσης της έκφρασης του HIF-1α, έχει επίσηςδειχθεί ότι ο παράγοντας ραπαμυκίνη αναστέλλοντας τη δράση του mTOR, οδηγεί σε μείωση της επαγόμενης από την υποξία συσσώρευσης του HIF-1α και της εξαρτώμενης από τον HIF-1 μεταγραφής, αναστέλλοντας την κυτταρική απόκριση στο υποξικό στρες (270).

Τέλος, για τη στόχευση του HIF-1α χρησιμοποιείται ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων που λειτουργούν μέσω άλλων μηχανισμών (Πίνακας 4). Σε αυτούς περιλαμβάνεται το torotecan, ένας αναστολέας της τοποϊσομεράσης, και γνωστοί κυτταροτοξικοί παράγοντες που έχειδειχθεί ότι αναστέλλουν τη μετάφραση του HIF-1α και χρησιμοποιούνται στην πράξη για να στοχεύσουν καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών και του πνεύμονα. Ένας άλλος αναστολέας της έκφρασης του HIF-1α είναι και ο PX-478, ο οποίος βρίσκεται στη φάση 1 κλινικών δοκιμών. Άλλοι γνωστοί παράγοντες που λειτουργούν παρεμποδίζοντας την έκφραση ή τη δράση του HIF-1α είναι οι τριχοστατίνη Α και FK228, οι οποίοι αποτελούν αναστολείς της απακετυλάσης των ιστονών, και οι καρδιακές γλυκοσίδες όπως η διγοξίνη, που δοκιμάστηκαν ως αναστολείς του HIF-1 με πιθανή αντικαρκινική δράση. Έχουν δοκιμαστεί, επίσης, παράγοντες που στοχεύουν άλλους ρυθμιστές του μονοπατιού των HIF, όπως τους c-Myc, c-Met και συστατικά των μονοπατιών Ras και Wnt (222).

Πίνακας 4: Αντικαρκινικοί παράγοντες που αναστέλλουν τον HIF-1α και στοχεύουν το μονοπάτι του HIF-1. Αναγράφονται οι παράγοντες και τα μονοπάτια που στοχεύουν/μηχανισμοί δράσης (222).

Μηχανισμοί και σηματοδοτικά μονοπάτια που στοχεύονται	Ουσίες που δοκιμάστηκαν
Σηματοδότηση	
Υποδοχέας κινάσης τυροσίνης	Γενιστεΐνη (VEGFR)-bevacizumab (avastin) (EGFR)-Iressa/gefitinib Tarceva/erlotinib C225/cetuximab
Ras–MAPK μονοπάτι	PD98059 BAY 43-9006 (sorafenib)
PI3K–AKT μονοπάτι	LY294002 Wortmannin Nelfinavir (HIV protease inhibitor) Silibinin NO-sulindac

mTOR	Ραπαμυκίνη Temsirolimus/CC1-779 Everolimus/RAD001
HSP90	Γενδαναμυκίνη 17AAG Απιγενίνη
Διαλυτή γουανιλυλοκυκλάση (sGS)	YC-1 (ενεργοποιητής sGC)
COX-2	NS398 Ibuprofen
Απακετυλάση ιστονών	SAHA FK228 LAQ824 Τριχοστατίνη A
Μικροσωληνίσκοι Αποσταθεροποιητές μικροσωληνίσκων	Κουρκουμίνη EF24 2-ME2 ENMD-1198
Σταθεροποιητές μικροσωληνίσκων	Ταξόλ
Σύνδεση/καταστροφή του DNA /κυτταροτοξικότητα Σύνδεση στο DNA	Εχινομυκίνη Πολυαμίδιο DJ12 Δοξορουβικίνη Cisplatin

p53 Αλληλεπίδραση p53–HDM2	Nutlins RITA
Μεταγραφή	PX-478 Tunicamycin UVC ακτινοβολία
Τοποϊσομεράση I/II	Topotecan NSC-644221
Αντιγραφή/ μεταγραφή DNA Τοποϊσομεράση I/II	Irinotecan
Μιτοχόνδρια	Alkylimino- phenylacetate Αντιμυκίνη Rotenone Myxothiazol
Άλλα Οξειδοαναγωγικό σύστημα θειορεδοξίνης RNA πολυμεράση Σύνθεση/επιδιόρθωση DNA Διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (Ras–MAPK; P13K–AKT) CDK	Πλευροτίνη TAS106 (ECyd) TS-1 Resveratrol Φλαβοπιριδόλη

A.8.3 Χρήση πεπτιδίων για τη στόχευση του HIF-1α

Στα πλαίσια ανάπτυξης στρατηγικών στόχευσης του HIF-1α, χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια που είτε συνδέονται άμεσα στον HIF-1α και τον αναστέλλουν, είτε αποτελούν πεπτίδια του ίδιου του HIF-1α που λειτουργούν ανταγωνιστικά ως προς αυτόν.

Υπάρχουν παραδείγματα πεπτιδίων που αναστέλλουν τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το κυκλικό εξαπεπτίδιο CLLFVY, το οποίο λειτουργεί ως αναστολέας της αλληλεπίδρασης HIF-1α-ARNT, in vitro και μέσα στα

κύτταρα. Το πεπτίδιο συνδέεται άμεσα με την περιοχή PAS-B του HIF-1α και αναστέλλει το σχηματισμό λειτουργικού συμπλόκου HIF-1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και της διαμεσολαβούμενης από αυτόν απόκρισης στην υποξία, χωρίς όμως να επηρεάζει τη δράση της ισομορφής HIF-2 (271).

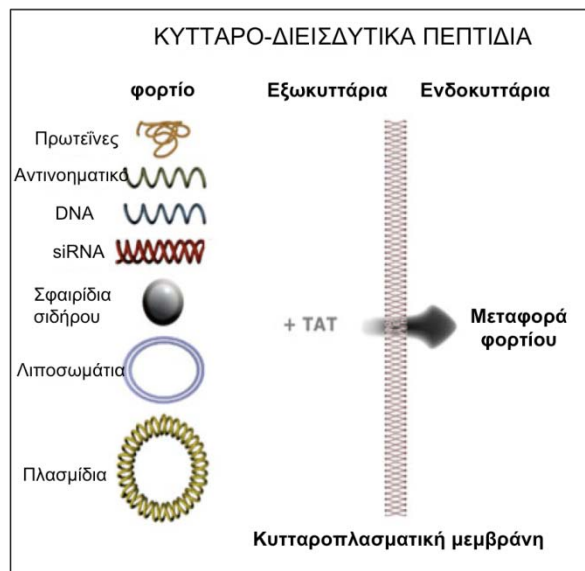
Έχει επίσηςδειχθεί, ότι το κυτταροδιεισδυτικό πεπτίδιο 6His-Tat-Ainp1 αναστέλλει τη λειτουργία του HIF-1, χωρίς να επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υπομονάδων HIF-1α και ARNT. Το πεπτίδιο Ainp1 συνδέεται άμεσα στην bHLH περιοχή του ARNT, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται ο ετεροδιμερισμός του με τον HIF-1α και να μειώνεται η επαγωγή των γονιδίων στόχων της υποξίας (272).

Ακόμη, έχουν κατασκευαστεί πεπτίδια που αναστέλλουν την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τους συμπαράγοντες της μεταγραφής p300/CBP. Το πολυπεπτίδιο TAD-C, προερχόμενο από την καρβοξυτελική επικράτεια μεταγραφικής ενεργοποίησης του HIF-1α και συγκεκριμένα από την ελάχιστη περιοχή που απαιτείται για τη δέσμευση της CH1 περιοχής του p300, ανταγωνίζεται τον HIF-1α για τη σύνδεση με τον p300. Καθώς δεσμεύεται το ίδιο στην περιοχή CH1, αναστέλλει την αλληλεπίδραση του ενδογενούς HIF-1α με τον p300, με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Πέρα από τον HIF-1 έχειδειχθεί ότι επηρεάζει τη δράση και άλλων παραγόντων που δεσμεύονται στην περιοχή CH1 του p300, όπως του STAT2, αλλά δεν αναστέλλει άλλες λειτουργίες του συμπλόκου p300/CBP (258).

A.9 Η τεχνολογία της πρωτεϊνικής μεταγωγής

Οι μεμβράνες των κυττάρων αποτελούν φυσικό φραγμό για βακτήρια, ιούς και μεγάλα υδρόφιλα μόρια, ενώ επιτρέπουν την είσοδο μικρών υδρόφοβων μορίων. Επίσης, παρεμποδίζουν τις θεραπευτικές ουσίες να φτάσουν στους στόχους τους, όταν εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος. Για το σκοπό αυτό, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται η τεχνολογία της πρωτεϊνικής μεταγωγής, η οποία βασίζεται στην ικανότητα κάποιων πρωτεϊνών ιικής προέλευσης να διαπερνούν τις βιολογικές μεμβράνες (273).

Τα CPP (Cell Penetrating Peptides) είναι μικρά κυτταροδιεισδυτικά πεπτίδια (μήκους 5-40 αμινοξέων) που χρησιμοποιούνται σε σύντηξη με μεγαλομόρια, όπως φάρμακα, αντισώματα, λιποσώματα, πεπτίδια, νανοσωματίδια και νουκλεϊκά οξέα, ώστε να διευκολύνουν τη μεταφορά τους μέσα στα κύτταρα (Εικόνα 29). Τα μεγαλομόρια συνδέονται με τα CPP με χημικούς ή με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Η σύνδεσή τους με τα CPP αυξάνει την ικανότητα τους να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και τη συγκέντρωσή τους στους ιστούς-στόχους (273).

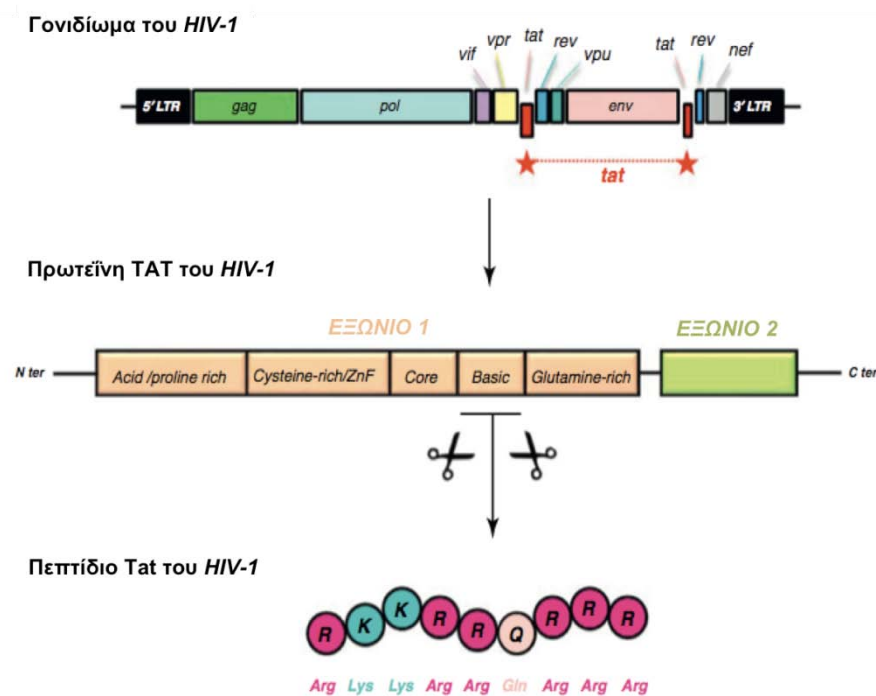


Εικόνα 29: Τα CPP χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά μεγαλομορίων δια μέσω των βιολογικών μεμβρανών. Πλασμίδια, λιποσώματα, μόρια RNA, πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται σε σύντηξη με τα CPP, προκειμένου να διευκολύνεται η διείσδυσή τους στα κύτταρα ([O' Brochta, IGTRCN, 2014](#), τροποποιημένη).

Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από 100 κυτταροδιεισδυτικά πεπτίδια που είναι ικανά να διευκολύνουν την ενδοκυττάρια πρόσληψη ουσιών. Τα πεπτίδια προέρχονται είτε από πρωτεΐνες με ικανότητα διείσδυσης σε κύτταρα, είτε αποτελούν χημεικές αλληλουχίες που προκύπτουν από την ένωση δύο φυσικών κυτταροδιεισδυτικών αλληλουχιών, ενώ μπορεί να είναι και συνθετικά, βάση πρόβλεψης της δομής τους. Ταξινομούνται σε τρεις τάξεις ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της αλληλουχίας τους, τα κατιονικά, τα αμφιπαθικά και τα υδρόφοβα (274).

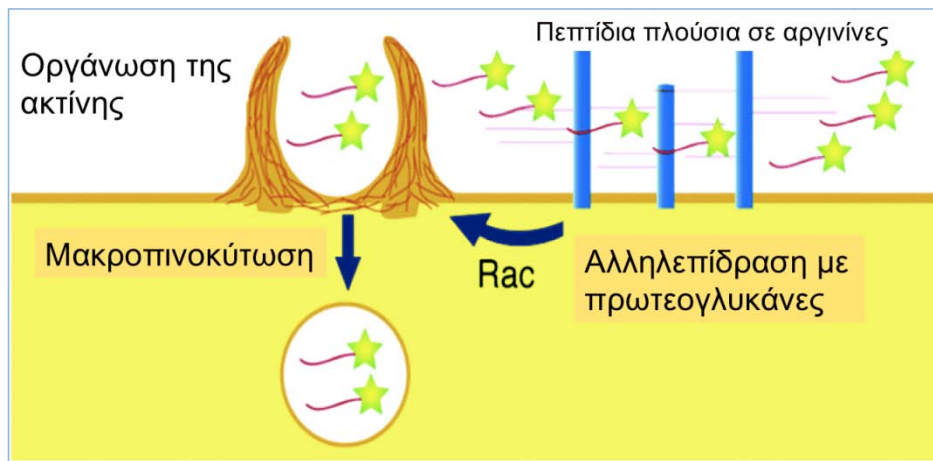
Η μεταφορά των μεγαλομορίων μέσα στα κύτταρα από τα CPP (κυρίως τα κατιονικά όπως το pTAT), πραγματοποιείται μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει την ενδοκύτωση και στη συνέχεια τη μεταφορά του “φορτίου” στα ενδοσώματα των κυττάρων των θηλαστικών. Έχουν περιγραφεί 3 βασικοί μηχανισμοί διείσδυσης των CPP, η απευθείας διείσδυση, η ενδοκύτωση και η διείσδυση μέσω του σχηματισμού παροδικών δομών (275).

Το πρώτο CPP που ανακαλύφθηκε το 1988 από δύο διαφορετικά εργαστήρια ήταν η πρωτεΐνη TAT (Trans-acting Activator of Transcription) του ιού HIV. Είναι μια πρωτεΐνη πρόσδεσης του RNA και έχει μεγάλη κυτταροδιεισδυτική ικανότητα. Παίζει καθοριστικό ρόλο στην εισβολή και στην έκφραση του ιϊκού γονιδιώματος στα κύτταρα του ξενιστή. Για την κυτταροδιεισδυτική ιδιότητα της πρωτεΐνης αυτής, υπεύθυνη είναι η περιοχή PTD (Protein Transduction Domain, αμινοξέα 49-57). Πρόκειται για μια κατιονική αμινοξική αλληλουχία αποτελούμενη από 9 αμινοξέα, πλούσια σε αργινίνες και λυσίνες (Εικόνα 30) (276).



Εικόνα 30: Το κυτταροδιεισδυτικό πεπτίδιο TAT του ιού HIV. Το πεπτίδιο TAT-PTD (αμινοξέα 49-57: RKKRRQRRR) της πρωτεΐνης TAT (Trans-acting Activator of Transcription) κωδικοποιείται από το γονιδίωμα του ιού HIV και ανήκει στα CPP (Cell Penetrating Peptides) (273), τροποποιημένη.

Το μικρό πεπτίδιο TAT-PTD διαμεσολαβεί τη μεταφορά μεγαλομορίων μέσα στα κύτταρα με τη διαδικασία της ενδοκυττώσης και συγκεκριμένα με μακροπinoκύτωση. Η μακροπinoκύτωση είναι το κύριο μονοπάτι εισόδου των πλούσιων σε αργινίνες πεπτιδίων στα κύτταρα. Δεν απαιτείται η μεσολάβηση υποδοχέα, χρειάζεται όμως την κατανάλωση ενέργειας. Η διαδικασία ξεκινάει με την αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων πεπτιδίων TAT με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη. Συγκεκριμένα, οι αργινίνες αλληλεπιδρούν με πρωτεογλυκάνες της μεμβράνης, και ειδικότερα με τις HSPG (Heparan Sulfate Proteoglycans), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Rac1. Η Rac1 είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στην οργάνωση της F-ακτίνης, ειδικότερα κατά το σχηματισμό των λαμελποδίων. Έτσι, μέσα σε λίγα λεπτά από τη ενεργοποίηση του μονοπατιού της Rac1, επάγεται η αναδιοργάνωση της ακτίνης και πραγματοποιείται η μακροπinoκύτωση επιτρέποντας την είσοδο των πεπτιδίων και του φορτίου τους στα κύτταρα (Εικόνα 31) (277-279).



Εικόνα 31: Το πεπτίδιο TAT διεισδύει στα κύτταρα με τη διαδικασία της μακροπινοκύτωσης. Η αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων πεπτιδίων με τις πρωτεογλυκάνες (HSPG) της κυτταρικής μεμβράνης, προωθεί την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στην αναδιοργάνωση της ακτίνης και την εγκόλπωση των πεπτιδίων TAT (277), τροποποιημένη.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Απώτερος στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της ρύθμισης των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων (HIF) από τη φωσφορυλίωση και της σημασίας του μηχανισμού αυτού στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Για τη διευκρίνιση του ρόλου της φωσφορυλίωσης των HIF ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Η πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει τη διερεύνηση της αναστολής του μονοπατιού της φωσφορυλίωσης των HIF, μέσω της πιθανής εμπλοκής φωσφατασών στη ρύθμιση τους στην υποξία. Η δεύτερη προσέγγιση αφορά τη μελέτη του ρόλου της αναστολής της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2 με έναν τεχνητό τρόπο, τη χρήση κυτταροδιεισδυτικών πεπτιδικών αναστολέων που βασίζονται στην ίδια την αλληλουχία του μεταγραφικού παράγοντα, στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.

Παρόλο που έχειδειχθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός κινασών είναι υπεύθυνος για την φωσφορυλίωση των HIF-α, ελάχιστα είναι γνωστά μέχρι τώρα για τις φωσφατάσες που επηρεάζουν τη δράση των HIF. Ένας από τους στόχους λοιπόν της παρούσας μελέτης, είναι η ταυτοποίηση των φωσφατασών που ρυθμίζουν τη δράση των HIF σε συνθήκες υποξίας, μέσω μιας ευρείας δοκιμασίας διαλογής φωσφατασών με πειράματα αποσιώπησης. Οι φωσφατάσες που θα προκύψουν από τη δοκιμασία διαλογής, θα διερευνηθούν περαιτέρω για το ρόλο τους στη ρύθμιση του μονοπατιού των HIF και στην προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στην υποξία.

Έχει δειχθεί ότι οι HIF συμβάλλουν όχι μόνο στη μεταβολική προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας, αλλά είναι επίσης υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση γονιδίων που προωθούν την κακοήθεια, την επιθετικότητα και τη μετάσταση. Επιπλέον, οι HIF καθιστούν τα υποξικά καρκινικά κύτταρα ανθεκτικά στη συμβατική χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία (245, 246). Στα πλαίσια του δεύτερου μέρους της διατριβής, θα μελετηθεί ο ρόλος της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2, στη διεκπεραίωση βασικών βιολογικών λειτουργιών των καρκινικών κυττάρων και στην επιβίωση τους σε συνθήκες υποξίας. Στην παρούσα εργασία, αντί να χρησιμοποιηθούν οι γνωστοί και γενικοί αναστολείς των ERK1/2, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μορφές της μικρής περιοχής ETD (ERK1/2 Targeted Domain, αμινοξέα 616-658) του HIF-1α, η οποία, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο Α.4, αποτελεί το υπόστρωμα των ERK1/2, και αναστέλλουν τη δράση του ενδογενούς HIF-1. Τα πεπτίδια που προέρχονται από την ETD περιοχή

χρησιμοποιήθηκαν ως βάση για την κατασκευή κυτταροδιαδυσδυτικών πεπτιδίων, προκειμένου να ανταγωνιστούν εκλεκτικά τη φωσφορυλίωση του ενδογενούς HIF-1α από τις ERK1/2. Τα πεπτίδια αυτά θα εξεταστούν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν ειδικά τη δράση του HIF-1 στα υποξικά καρκινικά κύτταρα και να παρεμποδίζουν την επιβίωση και ανάπτυξή τους.

Έτσι, η ανάλυση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε ενεργοποίηση ή καταστολή του HIF-1α καθώς και η ανάπτυξη ειδικών αναστολέων των HIF, είναι πολύ σημαντική όχι μόνο για την παραγωγή νέας γνώσης, αλλά και για τη χρήση τους σε συνδυασμό με τις παραδοσιακές θεραπευτικές μεθόδους ή άλλες στοχευμένες στρατηγικές για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών, όπως ο καρκίνος.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 ΥΛΙΚΑ

B.1.1 Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- ✓ Huh7, κυτταρική σειρά προερχόμενη από ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα - επιθηλιακού τύπου.
- ✓ HepG2, κυτταρική σειρά προερχόμενη από ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα - επιθηλιακού τύπου.
- ✓ HeLa, κυτταρική σειρά προερχόμενη από ανθρώπινο καρκίνο τραχήλου της μήτρας - επιθηλιακού τύπου.

B.1.2 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

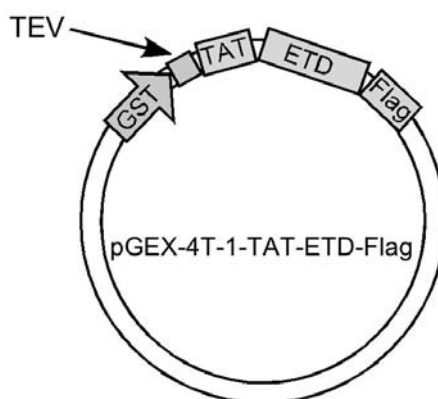
- ✓ TOP10 (Invitrogen), παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη και γονότυπο $F^{mcrA} \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galUgalK \lambda^{-} rpsL(Str^R) endA1 nupG$. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις εφαρμογές κλωνοποίησης.
- ✓ BL21 RIL (Stratagene), παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη και γονότυπο $E. coli B F^{-} ompT hsdS (rB - mB^{-}) dcm^{+} Tetr gal endA Hte [argU ileY leuW Camr]$. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση σε μεγάλη κλίμακα ανασυνδυασμένων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, καθώς έχουν τροποποιηθεί ώστε να εκφράζουν tRNA για τα αμινοξέα αργινίνη, λευκίνη και ισολευκίνη, τα οποία είναι σπάνια στα βακτήρια.

B.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

- ✓ pGEX-4T1 (Amersham)

Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης σε βακτηριακά κύτταρα. Φέρει τον υποκινητή PTac και το γονίδιο lacI για τον έλεγχο της έκφρασης του καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης. Περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site, MCS), παρέχοντας τη δυνατότητα έκφρασης των κλωνοποιημένων cDNA ως πρωτεΐνες σύντηξης με τη GST.

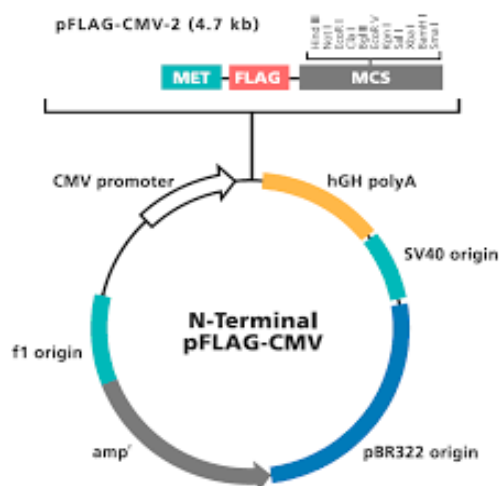
Επίσης, φέρει γονίδιο που παρέχει στα βακτηριακά κύτταρα ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Στο φορέα αυτό κλωνοποιήθηκαν τα cDNA των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG (wt, SA, SE, IA) τα οποία παράχθηκαν με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (δες παράγραφο Β.1.4) και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Το cDNA των πεπτιδίων εισάχθηκε στη θέση της ενδονουκλεάσης περιορισμού BamHI, που βρίσκεται εντός της MCS και μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί την GST (Εικόνα 32).



Εικόνα 32: Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου έκφρασης των διαφόρων μορφών των πρωτεϊνών GST-TAT-ETD-FLAG

✓ pFLAG-CMVTM-2 (Sigma)

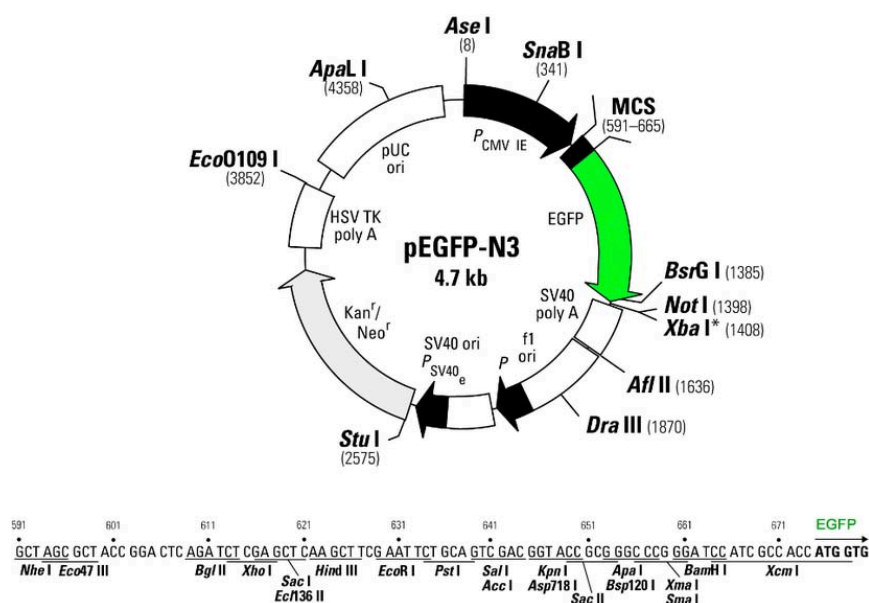
Πλασμιδιακός φορέας που φέρει τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMV, παρέχοντας τη δυνατότητα να εκφραστούν τα κλωνοποιημένα cDNA σε κύτταρα θηλαστικών σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG. Ο συγκεκριμένος επίτοπος εκφράζεται αμινοτελικά της εκφραζόμενης πρωτεΐνης και αποτελείται από μια αλληλουχία 8 αμινοξέων (DYKDDDDK). Το πλασμίδιο φέρει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Εικόνα 33). Στο φορέα αυτό ήταν κλωνοποιημένα τα cDNA που κωδικοποιούν για τις διάφορες μορφές της καλσινευρίνης (PPP3CA f.l., ΔCam wt και ΔCam HQ). Οι κατασκευές παραχωρήθηκαν από τον Dr. Marienfeld (173).



Εικόνα 33: Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pFLAG-CMVTM-2

✓ pEGFP-N3 (Clontech)

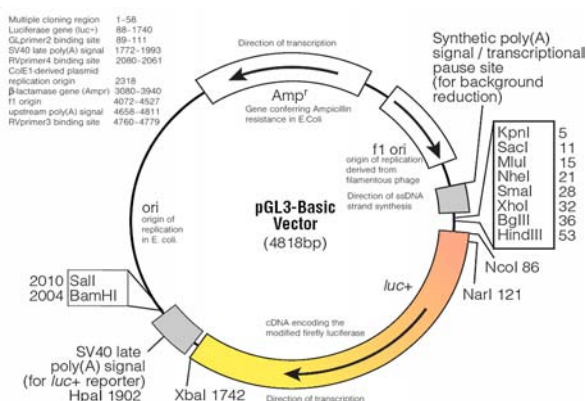
Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV. Επιτρέπει την έκφραση των κλωνοποιημένων cDNA ως πρωτεΐνες σύντηξης με την πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein) στο καρβοξυτελικό τους άκρο, καθώς η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τον επίτοπο GFP βρίσκεται στην 3' πλευρά της περιοχής MCS. Φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας για το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Στο φορέα αυτό κλωνοποιήθηκε το cDNA της πλήρους μεγέθους φωσφατάσης PDP1, το οποίο προηγουμένως απομονώθηκε με κατάλληλους εκκινητές (δες παράγραφο B.1.4) και PCR από ολικό cDNA κυττάρων HeLa. Το cDNA της PDP1 εισάχθηκε στο MCS στη θέση πέψης της ενδονουκλεάσης BamHI.



Εικόνα 34: Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N3

✓ pGL3-VEGF-5xHRE-Luc

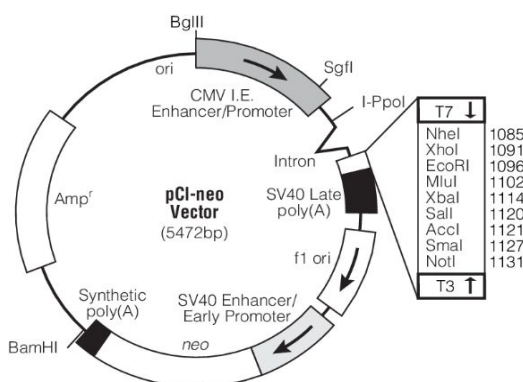
Φέρει τα χαρακτηριστικά του πλασμιδικού φορέα pGL3-Basic (Εικόνα 35). Εκφράζει τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο 5 στοιχείων απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements, HREs), τα οποία προέρχονται από τον υποκινητή του VEGF, κοινού γονιδίου-στόχου των HIF, και έχουν εισαχθεί στις θέσεις των περιοριστικών ενδονουκλεασών KpnI και BglII. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης της εξαρτώμενης από τους HIF μεταγραφικής ενεργότητας και αποτελεί ευγενική χορηγία του Dr. Giaccia (Department of Medicine, University of Stanford).



Εικόνα 35: Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδικού φορέα pGL3-Basic

✓ pCI-Renilla (Promega)

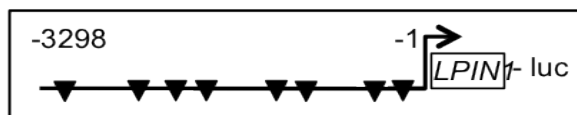
Όταν εισάγεται στα κύτταρα οδηγεί σε συνεχή έκφραση της λουσιφεράσης του θαλάσσιου οργανισμού *Renilla reniformes*, η οποία ελέγχεται από τον υποκινητή CMV. Χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ποσοστού διαμόλυνσης και την κανονικοποίηση των μετρήσεων της εξαρτώμενης από τους HIF μεταγραφικής ενεργότητας (Εικόνα 36).



Εικόνα 36: Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδικού φορέα pCI-neo

✓ pGL3-Lpin1-Luc

Ο φορέας αυτός φέρει ολόκληρο τον υποκινητή του γονιδίου της λιπίνης 1 (-3298bp έως -1bp) (*Lpin1*), ειδικού γονιδίου-στόχου του HIF-1, ο οποίος ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (Εικόνα 37). Ο υποκινητής του *LPIN1* και το cDNA της λουσιφεράσης εισάχθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGL3-Basic (Εικόνα 35). Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας αποκλειστικά της HIF-1 ισομορφής. Κατασκευάστηκε και περιγράφηκε από τους (236).



Εικόνα 37: Ο υποκινητής του γονιδίου ης *LPIN1*

B.1.4 Εκκινητές, ολιγονουκλεοτίδια και small interfering RNA (siRNA)

Οι εκκινητές και τα ολιγονουκλεοτίδια κατασκευάστηκαν από την εταιρία VBC-Biotech.

✓ Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για Real Time PCR:

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για την ενίσχυση του cDNA των παρακάτω γονιδίων με ποσοτική Real Time PCR:

Πίνακας 5: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για qRT-PCR.

Γονίδιο	Νοηματικός εκκινητής	Αντινοσηματικός εκκινητής
<i>PDP1</i>	AGGCTGGAACCTTCTGACTGG	CTCGTCGGAAGAATCGTT
<i>PDK1</i>	CTGGGTAATGAGGATTTGACTGT	AAGTCTGTCAATTTTCCTCAAAGG
<i>PPP3CA</i>	ACGCCAACCTTAACCTCCATCA	TGCTGTCCGTGCCGTTAGT
<i>VEGF</i>	CCCACTGAGGAGTCCAACATC	GGCCTTGGTGAGGTTTGATC
<i>LOX1</i>	CGACGACCCTTACAACCCCTAC	AAATCTGAGCAGCACCCTGTG
<i>P4HA1a</i>	AGGGGTTGCTGTGGATTACC	GTCATGTACTGTAGCTCGGC
<i>LIPIN1</i>	TTTCCACGTCCGCTTTGGG	GTGGCCAGGTGCATAGGG
<i>NDRG1</i>	GGGCTGAAAAGCATTATTGG	CCACCATCTCAGGGTTGTTT
<i>PAI-1</i>	GAAAGGCAACATGACCAGGC	CATGCGGGCTGAGACTATGA
<i>FSPI</i>	CTCCTCAGCGCTTCTTCTTTCTT	AAGCAGCTTCATCTGTCTTTT
<i>18S</i>	CTCAACACGGGAAACCTCAC	CGCTCCACCAACTAAGAACG
<i>β-actin</i>	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

- ✓ Αλληλουχίες oligονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR του γονιδίου της PDP1:

Νοηματικός εκκινητής: 5'-TTT **GGA TCC** ATG CCA GCA CCA AC-3'

Αντινοηματικός εκκινητής: 5'-TTT **GGA TCC** GAA TTC TTC TTG GTT TTG ATA CGC CCC-3'

Με έντονα γράμματα επισημαίνεται η αλληλουχία αναγνώρισης και πέψης από την ενδονουκλεάση BamHI και με υπογράμμιση η αλληλουχία πέψης της ενδονουκλεάσης EcoRI.

- ✓ Αλληλουχίες oligονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG:

Νοηματικός εκκινητής:

5'-TTTTT GGATCC **CGC AAG AAA CGC CGC CAG CGC CGC CGC** ACT ACC ACT GCC ACC ACT GAT G-3'

Αντινοηματικός εκκινητής:

5'-TTTTT GGATCC **TC** **AAGCTT** **GTC GTC ATC GTC TTT GTA GTC** TGG TGA TGA TGT GGC ACT AGT AG-3'

Με υπογράμμιση επισημαίνεται η αλληλουχία αναγνώρισης και πέψης από την ενδονουκλεάση BamHI, στη θέση της οποίας κλωνοποιήθηκαν τα cDNA των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1.

Με έντονα γράμματα επισημαίνεται στο νοηματικό εκκινητή, η αλληλουχία που κωδικοποιεί το πεπτίδιο TAT (9 αμινοξέα: RKKRRQRRR) του ιού HIV, το οποίο παρέχει στα πεπτίδια κυτταροδιδεισδυτική ικανότητα, και εκφράζεται στο αμινοτελικό τους άκρο. Στον αντινοηματικό κλώνο υπάρχει αντίστοιχα η αλληλουχία που κωδικοποιεί το οκταπεπτίδιο FLAG (DYKDDDDKL), το οποίο λειτουργεί ως επίτοπος για τον ενδοκυττάριο εντοπισμό των πεπτιδίων και εκφράζεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο.

Με κόκκινο χρώμα επισημαίνεται η αλληλουχία αναγνώρισης και πέψης από την ενδονουκλεάση HindIII, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ένθεσης των cDNA με σωστό προσανατολισμό μέσα στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης.

Με μπλε χρώμα επισημαίνεται το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής.

- ✓ siRNA που χρησιμοποιήθηκαν για την αποσιώπηση των φωσφατάσων.

Για την αρχική δοκιμασία διαλογής (screen) των φωσφατάσων που επηρεάζουν τη δράση των HIF σε συνθήκες υποξίας, πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της έκφρασης των καταλυτικών υπομονάδων 25 ανθρώπινων φωσφατάσων σερίνης/θρεονίνης ή διπλής εξειδίκευσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια βιβλιοθήκη siRNA (Ambion Silencer® Select Human Phosphatase siRNA Library – 4397919-AMO01Y9M (Life technologies-Thermo Fisher Scientific), η οποία παραχωρήθηκε από τον Dr. Gruss (University of Bonn, Germany). Η βιβλιοθήκη περιέχει 3 διαφορετικά siRNA για όλες (298) τις ανθρώπινες φωσφατάσες.

Τα mRNA της φωσφατάσης καλσινευρίνη (PPP3CA, CnA - NM_000944) και της φωσφατάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PPM2C, PDP1 – NM_018444) στοχεύτηκαν χρησιμοποιώντας τα ειδικά siRNA της Qiagen: Hs-PPP3CA-6 FlexiTube siRNA (SI02658614) και Hs-PPM2C-5 FlexiTube siRNA (SI02759372) αντίστοιχα. Ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το Allstars siRNA (Qiagen).

B.1.5 Αλληλούχιση (Sequencing)

Η επαλήθευση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των cDNA των πλασμιδιακών κατασκευών από τα οποία κωδικοποιούνται οι διάφορες μορφές του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG και η φωσφατάση PDP1 πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Eurofins Genomics - US.

B.1.6 Χημικές ενώσεις-Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας αποκτήθηκαν από τις εταιρίες Sigma (St.Louis, USA) και Applichem GmbH (Germany).

B.1.7 Υλικά Μοριακής Βιολογίας

Τα ένζυμα και υλικά για τα πειράματα μοριακής βιολογίας αποκτήθηκαν από τους οίκους New England BioLabs Inc, Takara, Applied Biological Materials Inc και Fermentas.

B.1.8 Αντισώματα

Τα αντισώματα που αναγράφονται παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοαποτύπωση κατά Western, τον ανοσοφθορισμό ή σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης:

- ✓ Πολυκλωνικό αντί-HIF-2α αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (Novus Biologicals) σε αραιώση 1:750.

- ✓ Πολυκλωνικό αντί-HIF-1α αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (94) σε αραίωση 1:1000.
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-ARNT αντίσωμα καθαρισμένο από ορό ποντικού (BD Biosciences) σε αραίωση 1:500.
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-beta actin αντίσωμα καθαρισμένο από ορό ποντικού (Cell Signalling) σε αραίωση 1:5000.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-GST αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (Amersham Biosciences) σε αραίωση 1:15000.
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-tubulin αντίσωμα καθαρισμένο από ορό ποντικού (Cell Signalling) σε αραίωση 1:10000.
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-FLAG M5 αντίσωμα καθαρισμένο από ορό ποντικού (Sigma-Aldrich) σε αραίωση 1:10000.
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-PP2B-Aa αντίσωμα καθαρισμένο από ορό ποντικού (Santa Cruz) σε αραίωση 1:500.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-PDP1 αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (Cell Signalling) σε αραίωση 1:1000.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-PDH αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (Cell Signalling) σε αραίωση 1:1000.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-pSer293 PDH αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (Novus Biologicals) σε αραίωση 1:1000.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-histone 3 αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (Santa Cruz) σε αραίωση 1:50000.
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-NPM1 αντίσωμα καθαρισμένο από ορό ποντικού (Millipore) σε αραίωση 1:3000.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-caspase 3 αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (Cell Signalling) σε αραίωση 1:1000.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-cleaved caspase 3 αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (Cell Signalling) σε αραίωση 1:1000.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-p44/p42 MAPK αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (Cell Signalling) σε αραίωση 1:1000.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-pERK1/2 αντίσωμα καθαρισμένο από ορό κουνελιού (Cell Signalling) σε αραίωση 1:1000.
- ✓ Συζευγμένα με υπεροξειδάση (για ανοσοαποτύπωση) (Cell Signalling – 1:3000) ή με Cy3/FITC (για ανοσοφθορισμό) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc – 1:300)

αντισώματα έναντι της IgG από κουνέλι, ποντικό ή κατσίκια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα.

B.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

B.2.1 Κλωνοποίηση cDNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Τα πλασμίδια είναι δίκλωνα, κυκλικά μόρια DNA που περιέχονται σε βακτηριακά κύτταρα. Ένα βακτήριο μπορεί να περιέχει ένα ή περισσότερα πλασμίδια, τα οποία είναι ανεξάρτητα από το κύριο μόριο του βακτηριακού DNA και περιέχουν μικρό ποσοστό της γενετικής πληροφορίας. Έχουν τη δυνατότητα να αντιγράφονται ημιαυτόνομα και μεταξύ άλλων, να φέρουν γονίδια που προσδίδουν αντίσταση σε αντιβιοτικά. Τα πλασμίδια έχουν την ικανότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό τόσο μεταξύ τους όσο και με το κύριο μόριο DNA, καθώς και να μεταφέρονται από ένα βακτήριο σε άλλο. Με τον τρόπο αυτό μετασχηματίζουν το βακτήριο στο οποίο εισέρχονται και του προσδίδουν νέες ιδιότητες. Για το λόγο αυτό αποτελούν πολύτιμα εργαλεία της Γενετικής Μηχανικής και παίζουν σπουδαίο ρόλο στην κλωνοποίηση γονιδίων και την παραγωγή των επιθυμητών πρωτεϊνών.

Η κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς βασίζεται στην ικανότητα του πλασμιδιακού DNA να διασπάται σε συγκεκριμένες θέσεις μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και να συνδέεται με ένα διαφορετικό τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια κατεργασία. Με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση, τα δύο είδη DNA ενώνονται. Στη συνέχεια το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισάγεται σε βακτηριακά κύτταρα με μια διεργασία που ονομάζεται μετασχηματισμός. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έναντι των κυττάρων που δεν περιέχουν το πλασμίδιο, βασίζεται στη χρήση κατάλληλων αντιβιοτικών, τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη μόνο των ανασυνδυασμένων κλώνων, οι οποίοι διαθέτουν ανθεκτικότητα σε αυτά. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα διάφορα στάδια της διαδικασίας κλωνοποίησης:

B.2.1.1 Ενίσχυση τμημάτων γονιδίων (DNA) με PCR

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) καθιστά δυνατή την ενίσχυση μιας καθορισμένης αλληλουχίας DNA με τη χρήση συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) και θερμοάντοχων πολυμερασών. Η ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας επιτυγχάνεται μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων. Ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, η οποία ακολουθείται από

την υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών σε κάθε κλώνο και τελικά την επιμήκυνση των θυγατρικών κλώνων από τη θερμοάντοχη DNA πολυμεράση. Έτσι, το επιθυμητό τμήμα DNA που λαμβάνεται είναι ειδικό (λήψη μοναδικού προϊόντος) και μπορεί παράγεται σε μεγάλες ποσότητες.

Στην παρούσα μελέτη ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν για τις διάφορες μορφές του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG (wt, SA, SE και IA), με τη χρήση των εκκινητών που περιγράφηκαν στην παράγραφο Β.1.4. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες μορφές του πλήρους μεγέθους του HIF-1α, οι οποίες κατασκευάστηκαν με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση του αγρίου τύπου HIF-1α από τους Mylonis et al., 2008. Για την ενίσχυση των αλληλουχιών αυτών χρησιμοποιήθηκε η υψηλής πιστότητας Vent πολυμεράση (New England Biolabs) λόγω της 3'-5' δραστικότητας εξονουκλεάσης που διαθέτει διορθώνοντας, έτσι, τυχόν λάθη που προκύπτουν κατά την επιμήκυνση των κλώνων του DNA.

Επιπλέον, ενισχύθηκε το cDNA του γονιδίου της φωσφατάσης PDP1 από ολικό cDNA κυττάρων HeLa, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο. Για την ενίσχυση του χρησιμοποιήθηκε η BesTaq πολυμεράση (Applied Biological Materials Inc), η οποία διαθέτει υψηλή πιστότητα.

Πίνακας 6: Συνθήκες της αντίδρασης PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του cDNA των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG και της φωσφατάσης PDP1 (Με έντονα γράμματα οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι).

	Μίγμα αντίδρασης	Συνθήκες αντίδρασης (x30 κύκλοι)
TAT-ETD-FLAG	<ul style="list-style-type: none"> - 200 ng εκμαγείο DNA (pcDNA3.1 Flag – HIF-1α wt/SA/SE/IA) - 1x Thermopol Buffer - 2 mM από κάθε dNTP - 1 unit Vent πολυμεράσης - 20 pmoles/μl από τον κάθε εκκινητή (νοηματικό - αντινοηματικό) - H₂O έως όγκο 50 μl 	<ul style="list-style-type: none"> - 5 min → 95°C Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA - 30 sec → 95°C Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA - 30 sec → 52°C Υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση - 1 min → 72°C Επιμήκυνση - 5 min → 72°C Τελική επιμήκυνση
	<ul style="list-style-type: none"> - 1 μg εκμαγείο DNA (ολικό cDNA κυττάρων HeLa) - 1x Buffer - 10 pmoles / μl από τον κάθε 	<ul style="list-style-type: none"> - 5 min → 95°C Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA - 1 min → 95°C Αποδιάταξη του

PDP1	εκκινητή (νοηματικό - αντινοηματικό) - 2 mM από κάθε dNTP - 1 unit Bestaq πολυμεράσης - 3% DMSO - H ₂ O έως όγκο 50 µl	δίκλωνου DNA - 1 min → 52°C Υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση - 2:30 min → 72°C Επιμήκυνση - 5 min → 72°C Τελική επιμήκυνση
-------------	---	--

Για το στάδιο υβριδοποίησης η θερμοκρασία υπολογίστηκε από το πρόγραμμα πρόβλεψης θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών (T_m) Oligo Calculator (<http://www.sciencelauncher.com/oligocalc.html>), ανάλογα με το μέγεθος και τη σύσταση των ολιγονουκλεοτιδίων σε βάσεις. Ο τύπος που ακολουθείται ευρέως για την εύρεση του T_m (για μικρούς εκκινητές ~25 νουκλεοτιδίων) είναι ο εξής:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR, 2 µl ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% για την PDP1 ή 2% για τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG, ώστε να ελεγχθεί η ορθότητα και η καθαρότητα του προϊόντος της αντίδρασης. Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με τη χρήση του πρωτοκόλλου «PCR clean-up kit» των εταιρειών Macherey-Nagel και αποτέλεσαν τα DNA ενθέματα, τα οποία κλωνοποιήθηκαν στη συνέχεια στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης (στον pGEX-4T1 τα cDNA που κωδικοποιούν τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG και στον pEGFP-N3 το cDNA της φωσφατάσης PDP1).

B.2.1.2 Πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οποιοδήποτε τμήμα DNA μπορεί να κοπεί σε μικρότερα τμήματα με τη βοήθεια ενζύμων που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού και αναγνωρίζουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Στην παρούσα διατριβή, η πέψη με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκε: 1) για τον έλεγχο της παρουσίας του DNA-ενθέματος μέσα σε έναν πλασμιδιακό φορέα και του προσανατολισμού του, 2) για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων που προορίζονται για κλωνοποίηση και 3) για το σχηματισμό συμπληρωματικών άκρων μεταξύ ενός DNA-ενθέματος και του πλασμιδιακού φορέα στον οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται σε μια αντίδραση πέψης καθορίζεται από την ενεργότητα του (Unit/µl). 1 unit ενζύμου ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1 µg DNA σε μια ώρα. Για τον έλεγχο του ενθέματος μέσα σε έναν πλασμιδιακό φορέα, η αντίδραση πέψης έγινε σε τελικό όγκο 20 µl

και περιείχε 1 μg πλασμιδιακού DNA, 1 Unit του κατάλληλου ενζύμου (New England Biolabs) και 1x κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που ορίζεται για κάθε ένζυμο από την εταιρεία παρασκευής. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στην καθοριζόμενη για το κάθε ένζυμο θερμοκρασία, συνήθως η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των ενδονουκλεασών περιορισμού είναι οι 37°C. Για το σχηματισμό συμπληρωματικών άκρων μεταξύ φορέα και ενθέματος, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 30 μl τελικό όγκο και διήρκησε 2 ώρες. Την τελευταία ώρα προστέθηκε, μόνο στην αντίδραση που αφορά τον πλασμιδιακό φορέα, το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (CIP), 20 Units (10.000 Unit/ml, New England Biolabs). Το ένζυμο αυτό επιτυγχάνει την αποφωσφορυλίωση των ελεύθερων 5' άκρων του φορέα, που προέκυψαν από την πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού, εμποδίζοντας, έτσι, την επανασύνδεσή των κολλωδών άκρων του φορέα απουσία ενθέματος.

B.2.1.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτή αгарόζης και η απομόνωσή τους από αυτή αποτελεί έναν τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση θερμασμένου διαλύματος αгарόζης για το σχηματισμό ενός πλέγματος, μετά την ψύξη του. Η πυκνότητα του πλέγματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αгарόζης στο διάλυμα. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο (θετικό πόλο). Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA μέσα στην πηκτή εξαρτάται από: το μέγεθος τους, τη διαμόρφωσή τους, τη συγκέντρωση της αгарόζης, τη διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα με συγκέντρωση 1% ή 2% σε αгарόζη, ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TAE) αποτελείται από 4 mM Tris-οξικό και 1 mM EDTA pH 8.0, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και λόγω της ιδιότητάς του να απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία και να την εκπέμπει στο ερυθρό ορατό φάσμα (590 nm), χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των τμημάτων DNA μέσα στην πηκτή. Το διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων αποτελείται από 5% γλυκερόλη, 0,42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,42% κυανού του ξυλενίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 100 V, για περίπου 30 λεπτά.

B.2.1.4 Εξαγωγή και καθαρισμός των τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό των επιθυμητών τμημάτων DNA από την πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Gel Extraction Kit της Qiagen. Η απομόνωση τμημάτων DNA σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να δεσμεύεται στη μεμβράνη σιλικόνης της στήλης παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, ενώ οι προσμίξεις διέρχονται από τη στήλη.

Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, το επιθυμητό τμήμα του DNA αποκόπηκε από την υπόλοιπη πηκτή και τοποθετήθηκε σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης (Eppendorf). Σε αυτό προστέθηκε το διάλυμα διαλυτοποίησης της αγαρόζης QC, σε αναλογία 300 μ l/100 mg πηκτής. Ακολούθησε θέρμανση για 10 λεπτά στους 50°C με περιοδική ανάδευση, ώστε να διαλυτοποιηθεί η πηκτή. Στο μίγμα προστέθηκε ισοπροπανόλη σε αναλογία 100 μ l/100 mg πηκτής, και μετά από καλή ανάδευση μεταφέρθηκε σε στήλη Qiaquick. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 13.000 \times g για 1 λεπτό, προκειμένου να συνδεθεί το DNA στο υλικό της στήλης. Στη συνέχεια προστέθηκε στη στήλη διάλυμα πλύσης PE, το οποίο περιέχει αιθανόλη, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις, ενώ το DNA παραμένει δεσμευμένο στο υλικό της στήλης. Η στήλη υφίσταται φυγοκέντρωση προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αιθανόλης και στη συνέχεια το DNA εκλύεται με προσθήκη 30 μ l ddH₂O. Μικρή ποσότητα από το έκλουσμα (2-4 μ l) ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης προκειμένου να γίνει κατ' εκτίμηση ποσοτικοποίηση του DNA που απομονώθηκε.

Με τη διαδικασία αυτή καθαρίστηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς και τα DNA ενθέματα μετά από τη διαδικασία του σχηματισμού συμπληρωματικών μεταξύ τους άκρων, προκειμένου να ακολουθήσει η εισαγωγή του ενθέματος μέσα στον πλασμιδιακό φορέα.

B.2.1.5 Αντίδραση λιγάσης

Ο πλασμιδιακός φορέας και το τμήμα του DNA-ενθέματος που έχουν κατεργαστεί με τα ίδια ένζυμα περιορισμού κι επομένως φέρουν συμπληρωματικά άκρα, μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά μεταξύ τους και να σχηματίσουν τη νέα πλασμιδιακή κατασκευή. Η διαδικασία αυτή καταλύεται από το ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4. Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων. Για την αντίδραση της λιγάσης ο πλασμιδιακός φορέας και το ένθεμα σε κατάλληλη κάθε φορά αναλογία μεταξύ τους, προστέθηκαν σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μ l, με ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (500 mM Tris-Cl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM

ATP, 25 µg/ml BSA pH 7.5), 2,5 Units ενζύμου λιγάσης (5 Unit/µl, New England Biolabs) και ddH₂O. Το μίγμα επώσθηκε ολονύχτια στους 16° C.

B.2.1.6 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent)

Σε στελέχη *E.coli* Top10 και BL21RIL έγινε εισαγωγή των πλασμιδίων ή των αντιδράσεων λιγάσης, με σκοπό να παραχθεί μεγάλη ποσότητα του επιθυμητού πλασμιδιακού DNA ή της εκφραζόμενης από αυτό ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Προκειμένου να γίνει αυτό εφικτό, εφαρμόστηκε μια τεχνική που έχει ως στόχο να επάγει την επιδεκτικότητα των βακτηριακών κυττάρων, ώστε να είναι ικανά να προσλάβουν πλασμιδιακό φορέα που περιέχει κλωνοποιημένο ένα ξένο τμήμα DNA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι βακτήρια κατεργασμένα με διαλύματα CaCl₂ στους 4°C και με ακόλουθη θέρμανση λίγων λεπτών, μπορούν να προσλάβουν DNA.

Για το σκοπό αυτό, 3 ml θρεπτικού TYM (2% τρυπτόνη, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 0,1 M NaCl και 10 mM MgSO₄) που περιέχει αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη ή χλωραμφαινικόλη εμβολιάστηκαν με αποικίες των Top10 ή BL21RIL αντίστοιχα και ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 37°C. Την επόμενη μέρα έγινε αραίωση της καλλιέργειας αυτής σε τελικό όγκο 50 ml χωρίς αντιβιοτικό και οι νέες καλλιέργειες επώσθησαν στους 37°C μέχρι OD_{600nm} = 0,4. Στο σημείο αυτό η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στα 4000xg για 5 λεπτά, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25 ml διαλύματος TFB-I (30 mM CH₃COOK, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl και 15% γλυκερόλη με pH 7) και επώσθηκε για 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 4000xg για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2 ml διαλύματος TFB-II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl και 20% γλυκερόλη με pH 7) και επώσθηκε για 1 ώρα στον πάγο. Στο σημείο αυτό τα δεκτικά κύτταρα είναι έτοιμα.

B.2.1.7 Μετασχηματισμός *E.coli* Top10 και *E.coli* BL21RIL

Για το μετασχηματισμό δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, προστέθηκαν 100 ng/µl από τα πλασμίδια που έχουν ήδη περιγραφεί (που κωδικοποιούν για τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG ή τις φωσφατάσες PDP1 και CnA) ή ολόκληρη η αντίδραση λιγάσης (20 µl), σε 50 µl κυττάρων Top10 ή BL21RIL, τα οποία στη συνέχεια επώσθησαν στον πάγο για 30 min. Μετά από θερμικό σοκ στους 42°C για 2 λεπτά, στα βακτηριακά κύτταρα προστέθηκαν 500 µl θρεπτικού LB (Luria Broth) χωρίς αντιβιοτικά και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 45 λεπτά. Αν πρόκειται για μετασχηματισμό με κάποιο γνωστό πλασμίδιο, το 1/10 της ποσότητας των κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλίο Πέτρι που περιέχει στερεό θρεπτικό υλικό LB-άγαρ με το

κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Αν πρόκειται για μετασχηματισμό με το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης, τότε πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 4000xg, όλο το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 50 μ l LB και επιστρώνεται σε τρυβλίο με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 12-16 ώρες. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων γίνεται παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού στα τρυβλία, καθώς τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο με το ξένο DNA πλασμίδιο αποκτούν ανθεκτικότητα σε αυτό.

Το θρεπτικό μέσο LB αποτελείται από 1% w/v Tryptone, 0.5% w/v Yeast extract, 1% NaCl. Στην περίπτωση παρασκευής στερεού θρεπτικού μέσου LB-άγαρ προστίθενται επιπλέον 20 g/l άγαρ. Η προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού γίνεται λίγο πριν την πήξη του θρεπτικού μέσου σε συγκέντρωση 100 μ g/ml.

B.2.1.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (Mini Preparation)

Σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής, εμβολιάστηκαν οι αποικίες που σχηματίστηκαν από τα μετασχηματισμένα κύτταρα Top10, και επωάστηκαν O/N στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Τα κύτταρα 1 ml της καλλιέργειας συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 5000xg για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 250 μ l διαλύματος T.E. (50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA), στο οποίο έχει προστεθεί 0.1 mg/ml RNase A. Στη συνέχεια, τα κύτταρα λύθηκαν με 250 μ l διαλύματος λύσης (0.2 M NaOH, 1% SDS) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση, ώστε να καταστεί ο μογενές. Κατόπιν, προστέθηκαν 300 μ l διαλύματος εξουδετέρωσης (3 M οξικό νάτριο pH 5.1) κι έγινε έντονη ανάδευση, με σκοπό την εξουδετέρωση του διαλύματος λύσης και το χονδρικό διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό και τις βακτηριακές πρωτεΐνες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 11000xg και μεταφορά του υπερκειμένου που περιέχει το πλασμιδιακό DNA σε νέο σωληνάκι. Το DNA κατακρημνίστηκε με προσθήκη 100% ισοπροπανόλης σε αναλογία κατ' όγκο 1:0.7, ψύξη στους -20°C για 20 λεπτά και φυγοκέντρηση στα 11000xg για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα ξεπλύθηκε με 500 μ l 70% αιθανόλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11000xg για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε εκ νέου και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει, ώστε να επαναδιαλυθεί τελικά σε 30 μ l αποστειρωμένου δις απιονισμένου νερού (ddH₂O). Για πιο καθαρή απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν στήλες καθαρισμού μεμβράνης

σιλικόνης και έτοιμα διαλύματα, με βάση το πρωτόκολλο του DNA purification kit της εταιρείας Macherey-Nagel.

Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε για την ύπαρξη και το σωστό προσανατολισμό του ενθέματος μέσα στο φορέα, με πένσεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά παραπάνω.

B.2.2 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG

Προκειμένου να εκφραστεί μια πρωτεΐνη σε βακτηριακά στελέχη, το cDNA της κλωνοποιείται σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει ισχυρό υποκινητή, ο οποίος συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένος με περιοχές του «χειριστή» (operator) του οπερονίου της λακτόζης. Τα κλωνοποιημένα cDNA βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση, διότι η παραπάνω περιοχή του χειριστή καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη «καταστολέα» που εκφράζεται από το *lacI* γονίδιο και η οποία δεν επιτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Το εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίηση των κλωνοποιημένων cDNA και της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών, δίνεται από τη λακτόζη ή χημικά ανάλογα της (π.χ. IPTG), τα οποία απενεργοποιούν τον καταστολέα. Έτσι, επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Τα πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις διάφορες μορφές του πεπτιδίου GST-TAT-ETD-FLAG χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματίσουν δεκτικά κύτταρα BL21RIL *E. coli*. Μία απομονωμένη αποικία κυττάρων εμβολιάστηκε σε 50 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB παρουσία των αντιβιοτικών αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη και η καλλιέργεια επώαστηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 37°C. Την επόμενη μέρα η αρχική αυτή καλλιέργεια αραιώθηκε σε 400 ml LB, τα οποία περιέχουν επίσης 1% σορβιτόλης και 50 mM διαλύματος φωσφορικών αλάτων pH 7, έτσι ώστε η νέα καλλιέργεια να έχει O.D._{600nm}=0,1. Η καλλιέργεια επώαστηκε υπό ανάδευση στους 37°C έως ότου η απορρόφηση της φτάσει στο 0,4. Στο στάδιο αυτό, η επαγωγή της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών επιτεύχθηκε με την προσθήκη στην καλλιέργεια 0,5 mM IPTG και επώαση για 1 ώρα στους 25°C. Τα βακτηριακά κύτταρα που εξέφρασαν τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG σε σύντηξη με GST, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 4000xg για 20 λεπτά. Στο σημείο αυτό το ίζημα των κυττάρων μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C.

Υπερέκφραση σε βακτηριακά κύτταρα BL21 πραγματοποιήθηκε και για την πρωτεάση TEV, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην συνέχεια για τον καθαρισμό των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG. Το γονίδιο της TEV ήταν κλωνοποιημένο σε πλασμιδιακό φορέα που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη και η πρωτεάση εκφράστηκε σε σύντηξη με 6 ιστιδίνες. Η

επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης His-TEV έγινε με 0,5 mM IPTG για 4 ώρες στους 30°C.

B.2.3 Καθαρισμός των GST-tagged πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγγιστείας και απομάκρυνση του GST επιτόπου

Οι διάφορες μορφές του πεπτιδίου GST-TAT-ETD-FLAG, μετά την έκφρασή τους στα κύτταρα BL21RIL, απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν με χρωματογραφικές μεθόδους, ενώ στο τέλος πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του επιτόπου GST.

B.2.3.1 Απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα κύτταρα BL21RIL

Τα κύτταρα *E. coli* που εξέφρασαν τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG σε σύντηξη με την GST, λύθηκαν με 8 ml (από 400 ml αρχικής καλλιέργειας) κατάλληλου διαλύματος λύσης, που αποτελείται από 20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0,2% Tween 20 και 1 mM DTT, καθώς και με υπερήχους, εφαρμόζοντας 5 παλμούς διάρκειας 20 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 40 δευτερολέπτων. Η διαδικασία αυτή έγινε σε πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στα 10000xg για 30 λεπτά στους 4°C, προκειμένου να διαχωριστεί το διαλυτό από το αδιάλυτο κλάσμα των πρωτεϊνών. Προκειμένου να είναι λειτουργικές, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες πρέπει να βρίσκονται στο διαλυτό κλάσμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην περαιτέρω διαδικασία καθαρισμού.

Για τις πεπτιδικές μορφές ETD wt και ETD SA η συγκέντρωση του NaCl στο διάλυμα λύσης ήταν 300 mM, καθώς ήταν απαραίτητη η αύξηση της ιονικής ισχύς για τη διατήρηση της διαλυτότητάς τους.

B.2.3.2 Καθαρισμός των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG

Για το διαχωρισμό των χημικών GST-πρωτεϊνών από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες των βακτηριακών εκχυλισμάτων, εφαρμόστηκε η μέθοδος της χρωματογραφίας αγγιστείας. Το διαλυτό κλάσμα των πρωτεϊνών επώαστηκε με σφαιρίδια γλουταθειόνης αгарόζης (Protino Glutathione Agarose 4B, Macherey-Nagel) για 1 ώρα στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 250 μl σφαιριδίων (για υλικό που προέρχεται από 400 ml καλλιέργειας), τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα πεπτίδια GST-TAT-ETD-FLAG δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια μέσω της τρaνσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), η οποία έχει ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 3000xg για 3 λεπτά

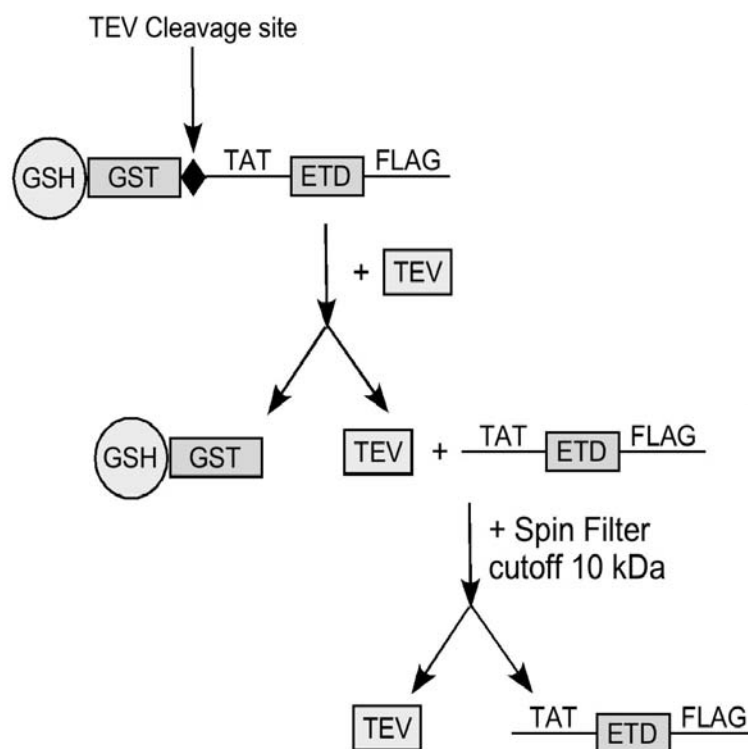
και το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει όλες τις υπόλοιπες πρωτεΐνες των βακτηριακών εκχυλισμάτων απορρίφθηκε, ενώ τα πεπτίδια GST-TAT-ETD-FLAG παρέμειναν δεσμευμένα στα σφαιρίδια. Ακολούθησαν 3 διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις της στήλης, με 5 ml διαλύματος λύσης.

Για τις πεπτιδικές μορφές GST-TAT-ETD wt-FLAG και GST-TAT-ETD SA-FLAG, προηγήθηκε διαπίδυση του διαλυτού κλάσματος πριν τη μεταφορά του στα σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η λύση των κυττάρων που εξέφρασαν αυτά τα πεπτίδια έγινε σε διάλυμα με υψηλή συγκέντρωση NaCl, η οποία θα προκαλούσε την έκλυση των πεπτιδίων από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης λόγω αυξημένης ιοντικής ισχύος κι έτσι δε θα ήταν δυνατή η απομόνωσή τους. Για το σκοπό αυτό, το διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα των βακτηριακών αυτών κυττάρων, επώαστηκε O/N στους 4°C υπό ανάδευση, σε 1 lt διαλύματος διαπίδυσης που περιέχει πολύ μικρή συγκέντρωση NaCl (50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl). Για τη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε ημιπερατή μεμβράνη, η οποία επέτρεψε τη μεταφορά άλατος από το μέρος υψηλής συγκέντρωσης (διαλυτό κλάσμα) στο μέρος χαμηλής συγκέντρωσης (διάλυμα διαπίδυσης), μέχρις ότου η συγκέντρωση NaCl μεταξύ των δύο πλευρών τις μεμβράνης εξισωθεί, χωρίς όμως να επιτρέπει τη μεταφορά των πρωτεϊνών. Την επόμενη μέρα, το διαλυτό κλάσμα απαλλαγμένο από το αλάτι μεταφέρθηκε στα σφαιρίδια γλουταθειόνης και ακολούθησε ο καθαρισμός, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Για την απομόνωση των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης, δεν πραγματοποιήθηκε έκλυση τους με τη χρήση της γλουταθειόνης όπως συνηθίζεται σε αυτά τα πρωτόκολλα, αλλά με τη χρήση της ανασυνδυασμένης πρωτεάσης His-TEV. Η TEV αναγνωρίζει μια αλληλουχία που βρίσκεται στο βραχίονα που συνδέει τον επίτοπο GST με το πεπτίδιο TAT-ETD-FLAG και υπάρχει στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1. Στο σημείο αυτό πραγματοποιείται πέψη από την πρωτεάση κι έτσι η GST απομακρύνεται από την υπόλοιπη πρωτεΐνη. Για το σκοπό αυτό, στα σφαιρίδια γλουταθειόνης τα οποία φέρουν καθηλωμένα τα πεπτίδια GST-TAT-ETD-FLAG, προστέθηκαν 5 μ g της πρωτεάσης His-TEV σε τελικό όγκο 1 ml κατάλληλου διαλύματος 50 mM Tris-HCL pH 8, 5 mM $MgCl_2$ και 1 mM DTT και πραγματοποιήθηκε επώαση O/N στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Το έκλουσμα παραλαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση στα 3000xg για 3 λεπτά και περιλαμβάνει τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG και τη His-TEV, ενώ η GST παρέμεινε συνδεδεμένη στα σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Για την απομάκρυνση της His-TEV από το έκλουσμα προκειμένου να παραληφθούν τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG σε καθαρή μορφή, πραγματοποιήθηκε διήθηση. Το έκλουσμα

πέρασε κατόπιν φυγοκέντρωσης, δια μέσω σωληνίσκου (microcon-10kDa centrifugal filter unit) που διαθέτει μεμβράνη η οποία επιτρέπει τη διέλευση μορίων μικρότερων των 10 kDa. Έτσι, στο κλάσμα που διέρχεται από τη στήλη συλλέχθηκαν τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG που έχουν μέγεθος ~7 kDa, ενώ η πρωτεάση His-TEV (~28 kDa) παρέμεινε στο συμπύκνωμα.



Εικόνα 38: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας καθαρισμού των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG που εκφράστηκαν σε κύτταρα BL21RIL *E. Coli*, με χρωματογραφία αγγιστείας.

B.2.4 Καθαρισμός των His-tagged πρωτεϊνών με χρωματογραφία ιόντων μετάλλου (Ni-NTA)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης εκφράστηκε σε κύτταρα BL21RIL και καθαρίστηκε η ανασυνδυασμένη πρωτεάση His-TEV, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τα βακτηριακά κύτταρα λύθηκαν με τη χρήση διαλύματος λύσης (50 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1% TritonX-100, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 5% glycerol) και υπερήχους. Στη συνέχεια, το διαλυτό κλάσμα επώαστηκε για 1 ώρα σε σφαιρίδια νικελίου (Ni-NTA Agarose), τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης. Οι χημική His-TEV συγκρατήθηκε στα σφαιρίδια Ni-NTA μέσω των ιστιδινών και διαχωρίστηκε από τις υπόλοιπες βακτηριακές πρωτεΐνες, οι οποίες

απορρίφθηκαν μετά από φυγοκέντρηση στα 3000xg για 3 λεπτά. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στη ρητίνη μπορούν να εκλουσθούν είτε με ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλού pH ή με ανταγωνισμό με ιμιδαζόλιο ή ιστιδίνη. Έτσι, στα σφαιρίδια έγιναν 3 διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα λύσης το οποίο περιείχε επιπλέον 50 mM ιμιδαζόλιο, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν ασθενικές μη ειδικές αλληλεπιδράσεις στα σφαιρίδια, και ακολούθησε έκλυση της πρωτεάσης His-TEV από τα σφαιρίδια με 300 mM ιμιδαζόλιο, σε τελικό όγκο 1 ml και δυνατό vortex σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν από τη χρήση της πρωτεάσης πραγματοποιήθηκε διαπίδυση για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου. Για το σκοπό αυτό, η έκλυση από τα σφαιρίδια νικελίου επώαστηκε O/N στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση σε διάλυμα διαπίδυσης (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 20 mM imidazole).

B.2.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford

Η περιεκτικότητα ενός δείγματος σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο Bradford. Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ των αρωματικών αμινοξέων μιας πρωτεΐνης και της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G250, σε όξινο περιβάλλον. Κατά τη συμπλοκοποίηση με πρωτεΐνες το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μεταβάλλεται από τα 470 nm στα 595 nm. Για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ενός δείγματος, το αντιδραστήριο που αποτελείται από 1 mg/ml της παραπάνω χρωστική σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Biorad), αναμιγνύεται με H₂O σε αναλογία 1/4 σε τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται μια μικρή ποσότητα του δείγματος και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετριέται στα 595 nm. Η απορρόφηση αυτή ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA).

B.2.6 Κυτταροκαλλιέργειες

Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) της εταιρίας Biosera, το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και 100 U/ml των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Biochrom). Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο στους 37°C σε 5% CO₂.

B.2.7 Πάγωμα και απόψυξη των κυττάρων για επανέναρξη καλλιέργειών

Για το πάγωμα των κυττάρων που βρίσκονταν σε καλλιέργεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS (Phosphate buffered saline) (8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, pH 7.4) και προστέθηκε σε αυτά 1 ml 0,2% τρυψίνης, ώστε να αποκολληθούν

από την επιφάνεια του τρυβλίου. Το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 2500xg, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM το οποίο περιέχει επιπλέον 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο). Ακολούθησε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους με τελική αποθήκευση σε υγρό άζωτο (-196 °C).

Η επανέναρξη καλλιιεργειών περιλάμβανε το άμεσο ξεπάγωμα των κυττάρων με θέρμανση στους 37°C και τη μεταφορά τους σε τρυβλίο που περιείχε 7 ml θρεπτικού μέσου DMEM προκειμένου να αναπτυχθούν.

B.2.8 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων, ως πρωτεΐνες σύντηξης με χαρακτηριστικές αλληλουχίες που είναι εύκολα ανιχνεύσιμες. Στα κύτταρα Huh7, η διαμόλυνση επιτεύχθηκε με τη χρήση ενός μη λιπιδικού πολυμερούς παράγοντα (Turbofect, Fermentas). Ο κατιονικός αυτός παράγοντας σχηματίζει συμπαγή, σταθερά, θετικά φορτισμένα σύμπλοκα με τις αρνητικά φορτισμένες αλυσίδες του νουκλεϊκού οξέος. Τα σύμπλοκα αυτά προστατεύουν το DNA από αποικοδόμηση και διαμεσολαβούν την αλληλεπίδραση του με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη του κυττάρου, επιτρέποντας την ενδοκύττωση του συμπλόκου.

Στα κύτταρα HeLa, η παροδική διαμόλυνση με πλασμιδιακό DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του παράγοντα PEI (Polyethylenimine). Πρόκειται επίσης για ένα σταθερό κατιονικό πολυμερές, το οποίο περικλείει το DNA μέσα σε θετικά φορτισμένα σωματίδια, τα οποία δεσμεύονται στην ανιονική κυτταρική επιφάνεια. Το σύμπλοκο PEI-DNA εισέρχεται στα κύτταρα με ενδοκύττωση και το DNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα.

Και για τους δύο παράγοντες διαμόλυνσης, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν κοινή. Σε θρεπτικό υλικό DMEM απουσία αντιβιοτικών και ορού προστέθηκε το πλασμιδιακό DNA και το μέσο διαμόλυνσης σε αναλογία 1:2. Η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε για τις πλάκες των 24 πηγαδιών ήταν 0,75 μg, για τις πλάκες 12 πηγαδιών ήταν 1 μg και για τα πιάτα των 60mm ήταν 1,5 - 2 μg. Ακολούθησε επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, προκειμένου να σχηματιστούν τα σύμπλοκα. Κατόπιν, στο μίγμα διαμόλυνσης προστέθηκε DMEM με 5% FBS και μεταφέρθηκε στα κύτταρα. Έγινε επώαση των κυττάρων για 4 ώρες στους 37° C, 5% CO₂ παρουσία του μίγματος διαμόλυνσης και στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και προστέθηκε σε αυτά πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε επώαση για 16 έως 24 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες,

ώστε να εκφραστεί το πλασμιδιακό DNA που εισάχθηκε. Την επόμενη μέρα, έγινε η κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων, ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που θα ακολουθούσε.

B.2.9 Αποσιώπηση της έκφρασης με siRNA

Ο ορισμός “RNA παρέμβαση” (RNA interference-RNAi) ή αποσιώπηση της έκφρασης κάποιου RNA, αναφέρεται σε έναν θεμελιώδη βιολογικό μηχανισμό κυτταρικής ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων μετά-μεταγραφικά. Η εκκίνηση του γίνεται από πρόδρομα δίκλωνα μόρια RNA (double-stranded RNA-dsRNA) των οποίων το μέγεθος και η προέλευση ποικίλει. Στη συνέχεια, αυτά συμμετέχουν στην αναγνώριση συμπληρωματικών μονόκλωνων μορίων RNA και επάγουν είτε τη διάσπαση και αποικοδόμηση ή τη μεταφραστική καταστολή των τελευταίων.

Ρόλο κλειδί στη διαδικασία της αποσιώπησης έχουν οι μονόκλωνες αλυσίδες των «μικρών παρεμβατικών RNA» (short-interfering RNA-siRNA) που έχουν συμπληρωματική νουκλεοτιδική αλληλουχία με τις αλυσίδες των mRNA-στόχων τους. Τα siRNA κατευθύνουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες, που συμμετέχουν στο μονοπάτι της RNAi, στο στοχευόμενο mRNA, προκειμένου αυτές να αποικοδομήσουν το mRNA-στόχο σε μικρότερα κομμάτια τα οποία δε μπορούν πλέον να μεταφραστούν σε λειτουργικό πολυπεπίδιο.

Για την αποσιώπηση της έκφρασης των φωσφατασών που ελέγχθηκαν στο αρχικό screening, έγινε διαμόλυνση των κυττάρων HeLa με τα siRNA της βιβλιοθήκης Ambion Silencer® Select, μέσω εγκλωβισμού τους σε λιποσώματα με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 RNAiMAX (Invitrogen). Ως αρνητικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε το AllStars-siRNA (Qiagen), το οποίο δεν παρουσιάζει ομολογία με κανένα γνωστό mRNA θηλαστικών. Για κάθε θέση του τρυβλίου των 96 θέσεων, σε 10 μ l DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικό, προστέθηκαν 20 nM από το εκάστοτε siRNA. Σε ένα δεύτερο σωληνίσκο αναμίχθηκαν τα πλασμίδια αναφοράς που κωδικοποιούν τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας και τη Renilla λουσιφεράση με τον παράγοντα διαμόλυνσης RNAiMAX. Μετά από ανακίνηση των δύο μικροσωληνίσκων το περιεχόμενο τους αναμίχθηκε και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, για να δημιουργηθούν λιποσώματα που έχουν έγκλειστα τα siRNA των διαφόρων φωσφατασών. Στη συνέχεια τα λιποσώματα μεταφέρθηκαν στα κύτταρα (~50% επικάλυψη επιφάνειας τρυβλίου), τα οποία επώαστηκαν για 4 ώρες στους 37°C, 5% CO₂ σε θρεπτικό μέσο DMEM με ορό αλλά χωρίς αντιβιοτικό. Μετά το πέρας των 4 ωρών τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και προστέθηκε εκ νέου θρεπτικό μέσο DMEM με ορό αλλά χωρίς αντιβιοτικά και τα κύτταρα επώαστηκαν για 40

περίπου ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες. Ακολούθησε η επεξεργασία των κυττάρων ανάλογα με τις απαιτήσεις της μετέπειτα πειραματικής διαδικασίας.

Για τα μετέπειτα πειράματα αποσιώπησης των φωσφατασών CnA και PDP1, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι παράγοντες διαμόλυνσης, που επιλέχθηκαν με βάση την πειραματική διαδικασία που θα ακολουθούσε τη διαμόλυνση. Οι παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι Lipofectamine 2000 (Invitrogen), Viromer® Blue (lipocalyx) και jetPrime (Polyplus). Για τον παράγοντα Lipofectamine 2000, το πρωτόκολλο περιγράφηκε προηγουμένως. Ο παράγοντας Viromer® Blue αποτελείται από ένα μεσαίου μεγέθους διακλαδισμένο πολυμερές που μιμείται τον τρόπο μόλυνσης των κυττάρων από τον ιό της γρίπης και η ικανότητά του να διαμολύνει τα κύτταρα βασίζεται στη δομή, το ουδέτερο φορτίο του συμπλόκου Viromer® Blue – siRNA και σε έναν ενεργό μηχανισμό εξόδου των συμπλόκου από τα ενδοσωμάτια, που επιτρέπει την είσοδο των μορίων siRNA στο κυτταρόπλασμα. Η διαδικασία διαμόλυνσης με τον συγκεκριμένο παράγοντα ήταν η εξής: Σε ένα σωληνίσκο τύπου erppendorf προστέθηκε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, που παρέχεται από τον κατασκευαστή, και το siRNA, ώστε στον τελικό όγκο της καλλιέργειας έχει συγκέντρωση 25 nM. Σε ένα δεύτερο σωληνίσκο προστέθηκε ο παράγοντας Viromer® Blue, στο τοίχωμά του, και το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Οι όγκοι του ρυθμιστικού διαλύματος και του παράγοντα διαμόλυνσης ορίστηκαν κάθε φορά ανάλογα με το μέγεθος του τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ύστερα από καλή ανάδευση, τα περιεχόμενα των δύο σωληνίσκων αναμίχθηκαν και ακολούθησε επώαση του μίγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, το μίγμα διαμόλυνσης μεταφέρθηκε στα κύτταρα και προστέθηκε μικρή ποσότητα πλήρους θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες και κατόπιν προστέθηκε πλήρες θρεπτικό μέσο στα κύτταρα, χωρίς να απομακρυνθεί το μέσο διαμόλυνσης. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 40 περίπου ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες, προκειμένου να επιτευχθεί η αποσιώπηση των φωσφατασών και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν ανάλογα με τη μετέπειτα διαδικασία.

Όσον αφορά τον παράγοντα jetPrime, πρόκειται για ένα μη ιονικό παράγοντα διαμόλυνσης, που χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα διαμόλυνσης με πλασμιδιακό DNA και siRNA ταυτόχρονα. Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα αναμίχθηκαν το ρυθμιστικό διάλυμα που διατίθεται από το κατασκευαστή, siRNA σε τελική συγκέντρωση 20 nM και κατάλληλη συγκέντρωση DNA (0,5 µg για τα τρυβλία των 24 θέσεων). Πραγματοποιήθηκε ανάδευση και κατόπιν προστέθηκε κατάλληλος όγκος του παράγοντα jetPrime, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (1,5 µl για τα τρυβλία των 24 θέσεων). Έγινε εκ νέου ανάδευση του

μίγματος, το οποίο στη συνέχεια επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα μεταφέρθηκε στα κύτταρα, στα οποία προστέθηκε επίσης πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM, και αφέθηκαν να αναπτυχθούν για περίπου 40 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες, χωρίς να αντικατασταθεί το μέσο καλλιέργειας. Έπειτα, τα κύτταρα επεξεργάστηκαν ανάλογα με τη μετέπειτα διαδικασία.

B.2.10 Συνθήκες επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α και επίδραση ουσιών στα κύτταρα

Η επαγωγή των HIF στις διάφορες κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε με επώαση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας (1% O₂), οι οποίες διασφαλίζονται σε ειδικό θάλαμο υποξίας IN VIVO₂ (Baker Ruskinn).

Για την περαιτέρω μελέτη της επαγωγής των HIF, σε κύτταρα που επώαστηκαν αποκλειστικά σε συνθήκες νορμοξίας, έγινε επίδραση με 1mM του αναστολέα των προπυλ-υδροξυλασών DMOG (Dimethyloxalyglycine, Alexis Biochemicals) για 8 ώρες.

Για την επαγωγή της δράσης της φωσφατάσης CnA, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία του ιονοφόρου που αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου Ionomycin (Cayman Chemicals), σε συγκέντρωση 1μM για 1 ώρα σε φυσιολογικές συνθήκες και κατόπιν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 8 ώρες.

B.2.11 Επίδραση στα καρκινικά κύτταρα με τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG

Η επίδραση στα κύτταρα Huh7 με τα ανασυνδυασμένα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG, πραγματοποιήθηκε με απευθείας προσθήκη τους στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων, σε συγκέντρωση 3μg/ml. Ακολούθησε 1 ώρα προ-επώαση των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες και κατόπιν σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας για χρονική περίοδο που εξαρτάται από την κάθε πειραματική διαδικασία. Για πειράματα με μεγάλη χρονική διάρκεια έγινε ανανέωση της συγκέντρωσης των πεπτιδίων στο μέσο καλλιέργειας των κυττάρων κάθε 24 ώρες, προκειμένου τα κύτταρα να βρίσκονται πάντοτε υπό την επίδραση των πεπτιδίων.

B.2.12 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Για την απομόνωση του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, τα κύτταρα κατεργάστηκαν με δύο διαφορετικούς τρόπους. Στην περίπτωση που το πρωτεϊνικό εκχύλισμα προοριζονταν για ανοσοκατακρήμνιση, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS 1x και αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με τη χρήση διαλύματος λύσης αποτελούμενο από 25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1 mM DTT και 0,1 mM PMSF. Το PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών σερίνης και προστίθεται ακριβώς πριν τη χρήση στο διάλυμα λύσης,

ώστε να προστατέψει τις πρωτεΐνες από την πρωτεόλυση. Το κυτταρικό εκχύλισμα, έπειτα από καλή ανακίνηση με vortex, επωάστηκε για 30 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκε στα 12000xg για 15 λεπτά στους 4°C. Στο υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί το πρωτεϊνικό δείγμα, προστέθηκε 1 mM DTT και διάλυμα Laemli (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25 mM DTT) πριν την ανάλυσή του με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.

Στην περίπτωση που σκοπός ήταν η ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών για τον έλεγχο των επιπέδων τους, τα κύτταρα λύθηκαν απευθείας σε διάλυμα Laemmli. Στα κυτταρικά λύματα προστέθηκε 1 mM DTT και ακολούθησε επίδραση υπερήχων σε πολύ μικρή ένταση για λίγα δευτερόλεπτα, προκειμένου να επιτευχθεί η θραύση του ιζώδους γενετικού υλικού. Ακολούθησε θέρμανση των κυτταρικών λυμάτων στους 95 °C για 5 λεπτά και αποθήκευση στους -20 °C, μέχρι την ανάλυση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.

B.2.13 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους μέγεθος. Βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης των φορτισμένων μορίων διαμέσου των πόρων μιας πηκτής, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Τα βασικά υλικά της μεθόδου είναι μια ασυνεχής πηκτή πολυακρυλαμιδίου και το άλας νατρίου του θειικού δωδεκυλίου (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS). Η πηκτή ακρυλαμιδής είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από επιμήκεις αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου και σχηματίζεται από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του NN-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμιδίου, που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία σταυροδεσμών. Το μέγεθος των πόρων του πλέγματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μονομερών ακρυλαμιδίου και ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών, με την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (APS) και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED).

Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που δρα ως αποδιατακτικό μέσο, και εφόσον δεσμευτεί στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων δεσμών, τους προσδίδει επιμήκη δομή και καθαρό αρνητικό φορτίο. Η πρόσδεση του SDS στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες προκαλεί ομοιόμορφη κατανομή του φορτίου ανά μονάδα μάζας, έχοντας ως αποτέλεσμα η ηλεκτροφορητική ικανότητα των πρωτεϊνών να είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού τους μεγέθους και να μην επηρεάζεται από το φορτίο και τη δομή τους. Έτσι, οι μικρού μεγέθους

πρωτεΐνες μετακινούνται γρηγορότερα μέσα στην πηκτή, ενώ οι μεγάλοι μεγέθους πρωτεΐνες παραμένουν πιο κοντά στο σημείο εκκίνησης.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές των εταιριών Hoeffer και Biorad. Η πηκτή διαχωρισμού (separating gel) αποτελείται από 10-15% ακρυλαμίδιο, 1,5 M Tris, 8 mM EDTA, 0,4% SDS, 0,04% υπερθειικό αμμώνιο και 0,02% TEMED σε H₂O με pH 8.8. Η πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) αποτελείται από 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,5 M Tris, 8 mM EDTA, 0,4% SDS, 0,08% υπερθειικό αμμώνιο, 0,04% TEMED σε H₂O με pH 6.8. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από 0,25 M Tris, 1,92 M glycine, 10 mM EDTA, 0,5% SDS και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 120V.

B.2.14 Χρώση πρωτεϊνών στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου με Coomassie Brilliant Blue

Προκειμένου να παρατηρηθεί το σύνολο των πρωτεϊνών που αναλύθηκαν με τη μέθοδο SDS-PAGE, η πηκτή βάφτηκε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue (Coomassie 0,1%, 10% οξικό οξύ, 50% μεθανόλη) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Κατόπιν η πηκτή αποχρωματίστηκε με επώαση σε διάλυμα 10% οξικού οξέος, 10% μεθανόλης για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Η πηκτή μπορεί να διατηρηθεί ενυδατωμένη σε νερό.

B.2.15 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Προκειμένου να ταυτοποιηθεί μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη ενός δείγματος, αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, εφαρμόζεται η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας αυτής είναι η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία βασίζεται στην κίνηση των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών από την πηκτή προς τη μεμβράνη κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού και στον εγκλωβισμό τους στο πλέγμα της μεμβράνης. Για το σκοπό αυτό, η πηκτή που περιέχει τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες τοποθετήθηκε μαζί με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μεταφοράς Tris-Borate pH 8.5 (125 mM Tris, 0,2% SDS, 0,5 mM DTT, ρύθμιση του pH με άλας βορικού οξέος) και κατόπιν στη συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς (TRANS-BLOT SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad), ώστε να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη με βάση υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Μέσα στη συσκευή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί, το οποίο είχε επίσης εμβαπτιστεί στο διάλυμα μεταφοράς. Η

επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης είναι άμεση και χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων αέρα, ώστε να μην παρεμποδίζεται η διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος και τοποθετούνται έτσι, ώστε η μεμβράνη να είναι προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και η πηκτή στον αρνητικό. Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε στα 10V για 60 λεπτά.

Αφού ολοκληρώθηκε η ηλεκτρομεταφορά, έγινε χρώση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη χρωστική Ponceau S (0,5% w/v Ponceau, 1% οξικό οξύ), προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της μεταφοράς των πρωτεϊνών. Το Ponceau είναι μια υδατοδιαλυτή ουσία ανοικτού ερυθρού χρώματος, που μπορεί να χρώσει αντιστρεπτά τις ζώνες των πρωτεϊνών. Κατόπιν η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλύθηκε με PBS-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση, μέχρι να αφαιρεθεί τελείως η χρωστική.

Το επόμενο στάδιο είναι η ανοσοανίχνευση, μια τεχνική που καθιστά δυνατό τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος. Ένα αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά την καθηλωμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο και η αλληλεπίδραση αυτή ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός δευτέρου αντισώματος, το οποίο εκτός του ότι είναι ικανό να αναγνωρίσει και να δεσμευθεί με τις ανοσοσφαιρίνες IgG του αρχικού αντισώματος, περιέχει στο μόριο του συζευγμένο κάποιο ένζυμο-δείκτη, όπως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση, το οποίο αντιδρώντας με ένα εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα, δίνει χαρακτηριστική αντίδραση χημειοφωταύγειας καταδεικνύοντας έτσι τη ζώνη του αντιγόνου.

Έτσι, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, επώαστηκε σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-0,1% Tween 20) για 1 ώρα, για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από την καζεΐνη του γάλακτος, προκειμένου να αποφευχθούν μη-εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολούθησε ξέπλυμα της μεμβράνης με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 λεπτά). Έπειτα, έγινε ολονύχτια επώαση με το εκάστοτε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, στην κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα κορεσμού, υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολούθησαν τρεις πεντάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα 1x PBS – 0.1% Tween20 και επώαση της για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με το δεύτερο αντίσωμα σε διάλυμα κορεσμού. Το αντίσωμα αυτό είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Τέλος, η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 λεπτά).

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η χρωμοαντίδραση επιτεύχθηκε με την προσθήκη 30 μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM κουμαρικού οξέος σε DMSO) σε 10ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM λουμινόλης σε 0,1 M Tris-Cl pH 8.5) για 1-2 λεπτά σε θερμοκρασία

περιβάλλοντος. Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο, δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου. Αυτές με τη σειρά τους αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ, δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος, οι οποίες τελικά οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3 αμινο-φθαλικό, αντίδραση η οποία εκλύει φως. Η λήψη εικόνων έγινε στη συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Alliance Software.

B.2.16 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης είναι δυνατή η απομόνωση μιας πρωτεΐνης από εκχυλίσματα κυττάρων, με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης-στόχου. Οι ανοσοσφαιρίνες που έχουν δεσμεύσει την πρωτεΐνη-στόχο απομονώνονται στη συνέχεια με τη χρήση αιωρήματος σφαιριδίων Σεφαρόζης-πρωτεΐνης A (Protein A-Sepharose), λόγω της ικανότητας της πρωτεΐνης A του *Staphylococcus aureus* να δεσμεύεται στη σταθερή περιοχή των ανοσοσφαιρινών IgG. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται ο εξειδικευμένος διαχωρισμός/καθαρισμός μιας πρωτεΐνης μέσα από ένα μίγμα πρωτεϊνών. Επίσης είναι δυνατόν κάτω από κατάλληλα διαμορφωμένες μη-αποδιατακτικές συνθήκες εφαρμογής της τεχνικής, να συγκατακρημνιστούν με αυτήν την πρωτεΐνη και άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες δεσμεύονται ισχυρά μαζί της (υποστρώματα, ρυθμιστές, κ.α.), προσφέροντας μια γενική εικόνα των αλληλεπιδράσεων στο φυσιολογικό περιβάλλον της πρωτεΐνης.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε 1 μg του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του HIF-1α (94) ή των IgG από κουνέλι σαν συνθήκη ελέγχου. Τα αντισώματα επώαστηκαν με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa τα οποία είχαν επωαστεί σε υποξία, για χρονικό διάστημα 2 ωρών υπό ανακίνηση στους 4°C, ώστε να αλληλεπιδράσουν με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν. Παράλληλα, τα σφαιρίδια Σεφαρόζης-πρωτεΐνης A εξισορροπήθηκαν με 3 πλύσεις των 10 λεπτών, σε ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, και παραλήφθηκαν μετά από σύντομη φυγοκέντρωση, με απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος. Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα κυτταρικά εκχυλίσματα, στα οποία έχουν σχηματιστεί τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-αντισώματος, μεταφέρθηκαν στα εξισορροπημένα σφαιρίδια. Η δέσμευση του αντισώματος στα σφαιρίδια διαρκεί 16 ώρες και πραγματοποιείται υπό συνεχή ανακίνηση στους 4°C. Ακολούθησαν 3 δεκάλεπτες πλύσεις των σφαιριδίων, με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να αποφευχθούν τυχόν μη-ειδικές ασθενείς αλληλεπιδράσεις τους με άλλες

πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων. Τέλος, οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν με διάλυμα φόρτωσης Laemli και αναλύθηκαν με SDS PAGE και ανοσοαποτύπωση.

B.2.17 Βιοχημική κλασμάτωση

Η κυτταρική κλασμάτωση είναι η διαδικασία διαχωρισμού και απομόνωσης των δομικών συστατικών του κυττάρου, όπως του πυρήνα, των μιτοχονδρίων, των ριβοσωμάτων, με σκοπό τη μελέτη της μορφολογίας και της λειτουργίας τους. Πραγματοποιείται σχετικά εύκολα, καθώς τα υποκυτταρικά οργάνδια διαφέρουν σε μέγεθος και πυκνότητα, γεγονός που επιτρέπει τον διαχωρισμό τους με φυγοκέντρωση. Στην παρούσα εργασία η κλασμάτωση εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό του πυρηνικού από το κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα των κυττάρων, όπως περιγράφεται στο (280).

Αρχικά τα κύτταρα Huh7 ξεπλύθηκαν δύο φορές με κρύο PBS 1x, αποκολλήθηκαν από το πιάτο με θρυψινοποίηση και συλλέχθηκαν κατόπιν φυγοκέντρωσης σε 100xg για 10 sec. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 400 μl υποτονικού διαλύματος (10 mM Hepes-KOH pH 7.9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM dithiothreitol και 0,2 mM PMSF) και επώαστηκε για 20 λεπτά στον πάγο. Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες συλλέχθηκαν στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρωση στις 2000xg για 10 λεπτά, στους 4° C. Το ίζημα, που αποτέλεσε το πυρηνικό πρωτεϊνικό κλάσμα, επαναιωρήθηκε σε 400 μl υπέρτονου διαλύματος (20 mM Hepes-KOH pH 7.9, 1,5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0,2mM EDTA, 0,5 mM dithiothreitol and 0,2 mM PMSF) και μετά από 20 λεπτά επώασης στον πάγο, το διαλυτό κλάσμα των πρωτεϊνών συλλέχθηκε στο υπερκείμενο με φυγοκέντρωση στις 10000xg για 5 λεπτά στους 4° C.

B.2.18 Μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό και φθορισμό, παρατήρηση μιτοχονδρίων και λιποσταγονιδίων

Με τη χρήση των τεχνικών μικροσκοπίας, είναι δυνατή η παρατήρηση της κατανομής μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο. Η παρατήρηση του υποκυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών πρωτεϊνών είναι δυνατή με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων ενάντια σε αυτές. Τα αντισώματα αυτά μπορεί να είναι συζευγμένα με μια φθορίζουσα ουσία (άμεσος ανοσοφθορισμός), είτε να αναγνωρίζονται από ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο φέρει τη φθορίζουσα ομάδα (έμμεσος ανοσοφθορισμός). Από την άλλη, με φθορισμό είναι δυνατή και η παρατήρηση των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών, το cDNA των οποίων εισάγεται εξωγενώς στα κύτταρα, και εκφράζονται σε αυτά σε σύντηξη με φθορίζοντες επιτόπους όπως η GFP (green fluorescent protein), μια φθορίζουσα πρωτεΐνη που διεγείρεται στα 488 nm

(EGFP) και εκπέμπει στα 509 nm. Στην περίπτωση αυτή, δεν είναι απαραίτητη η χρήση αντισώματος. Και στις δύο περιπτώσεις το σήμα του φθορισμού υποδεικνύει το υποκυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο βρίσκεται η υπό μελέτη πρωτεΐνη. Ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την απορρόφηση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος από μία φθορίζουσα ουσία και την εκπομπή του σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Η παρατήρηση του εκπεμπόμενου φωτός γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου, το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε κυρίως για την ενδοκυττάρια ανίχνευση των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG, του ενδογενούς HIF-1α, των διαφόρων μορφών της CnA σε κύτταρα Huh7 και HeLa. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm, ξεπλύθηκαν με PBS 1x και μονιμοποιήθηκαν με 3% φορμαλδεΰδη (σε PBS 1x) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 3 πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και κατόπιν έγινε κατεργασία με 0,1% Triton X-100 (σε PBS 1x) για 15 λεπτά στους 4°C, προκειμένου να καταστούν διαπερατές οι κυτταρικές μεμβράνες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα PBS 1x – 0,1% Tween20 για 5 λεπτά και πραγματοποιήθηκε κορεσμός των μη-ειδικών θέσεων με 1% BSA (σε PBS 1x-0,1% Tween20) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η επώαση των κυττάρων με το πρώτο αντίσωμα για 16 ώρες στους 4°C. Μετά από 3 διαδοχικές πεντάλεπτες πλύσεις των κυττάρων με PBS 1x – 0,1% Tween20, έγινε προσθήκη του δεύτερου αντισώματος, έναντι των IgG ποντικού ή κουνελιού, σε αραίωση 1:500 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δεύτερα αντισώματα ήταν συζευγμένα είτε με την φθορίζουσα ομάδα Cy3 (Cyanine, εκπομπή στα 570 nm) ή με την FITC (Fluorescein isothiocyanate, εκπομπή στα 525 nm). Τέλος, τα κύτταρα πλύθηκαν 2 φορές με PBS 1x – 0.1% Tween20, 1 φορά με PBS 1x και ακολούθησε μια τελευταία στιγμιαία εμβάπτιση σε H₂O. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα σταθεροποίησης του φθορισμού (Mowiol) το οποίο περιείχε και την φθορίζουσα ουσία DAPI (4',6-διάμινο-2-φαινυλινδολη, 2 μg/ml), η οποία προσδένεται στη χρωματίνη κι έτσι καθιστά τους πυρήνες διακριτούς. Η παρατήρηση των καλυπτρίδων έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axio Imager.Z2 εξοπλισμένο με αισθητήρα AxioCam MRm και φακούς με μεγέθυνση 40x ή 100x (καταδυτικός).

Επίσης, με άμεσο φθορισμό έγινε παρατήρηση των μιτοχονδρίων των κυττάρων HeLa καθώς και των λιποσταγονιδίων σε κύτταρα Huh7. Η σήμανση των μιτοχονδρίων πραγματοποιήθηκε με τη φθορίζουσα ουσία Mito Red (Sigma), η οποία προστέθηκε σε ζώντα κύτταρα σε τελική συγκέντρωση 100 nM σε θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς ορό, 15 λεπτά πριν τη μονιμοποίησή τους με φορμαλδεΰδη. Το Mito Red φθορίζει σε μήκος κύματος $\lambda_{em}=594$

nm. Για την παρατήρηση των λιποσταγονιδίων χρησιμοποιήθηκε το Nile Red (Sigma), μια φθορίζουσα ουσία η οποία δεσμεύεται στα ουδέτερα λιπίδια, τα οποία κατά κύριο λόγο συσσωρεύονται στα λιποσταγονίδια και η οποία φθορίζει σε μήκος κύματος $\lambda_{em}=635$ nm (281). Η επίδραση με το Nile Red πραγματοποιήθηκε μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων και αφού αυτά είχαν επωαστεί με το δεύτερο αντίσωμα. Ακολούθησαν 3 δεκάλεπτες πλύσεις με PBS 1x και κατόπιν έγινε επώαση με 0,1μg Nile Red (σε PBS 1x) για 30 λεπτά χωρίς ανακίνηση στο σκοτάδι. Μετά από τουλάχιστον 3x πλύσεις με PBS 1x και 2x με H₂O στη συνέχεια οι καλυπτρίδες σταθεροποιήθηκαν με mowiol.

B.2.19 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF

Η μέτρηση της ενεργότητας των HIF έγινε με τη βοήθεια μιας φωτομετρικής μεθόδου, που χρησιμοποιεί μία αντίδραση η οποία καταλύεται από ένζυμα που καλούνται λουσιφεράσες. Οι λουσιφεράσες είναι μία οικογένεια ενζύμων τα οποία καταλύουν οξειδωτικά τα υποστρώματα τους για να παράγουν φως. Αυτή η ιδιότητα τους οδήγησε στην ευρεία χρήση τους ως γονίδια αναφοράς.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η λουσιφεράση που προέρχεται από δύο διαφορετικούς οργανισμούς, την πυγολαμπίδα (Firefly luciferase) και το θαλάσσιο οργανισμό *Renilla reniformis* (*Renilla* luciferase), για τη μέτρηση της ενεργότητας των HIF (127). Οι λουσιφεράσες αυτές, εξαιτίας της διαφορετικής εξελικτικής τους προέλευσης, έχουν διαφορετική ανώτερη διαμόρφωση και, ως εκ' τούτου, είναι δραστικές σε διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης. Αυτές οι διαφορές καθιστούν δυνατή την επιλεκτική διάκριση μεταξύ των αντίστοιχων αντιδράσεων φωταύγειας του κάθε ενζύμου. Ως πλασμίδια γενετικής αναφοράς της επαγόμενης από τους HIF μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν τα pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pGL3-LPIN1-Luc, ενώ ως πλασμίδιο μάρτυρας της απόδοσης της διαμόλυνσης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε το pCI-Renilla, το οποίο κωδικοποιεί τη *Renilla* λουσιφεράση. Το πλασμίδιο pGL3-5xHRE-VEGF-Luc μετράει την ενέργεια και των δύο HIF-ισομορφών, ενώ το pGL3-LPIN1-Luc μόνο του HIF-1 (βλέπε παράγραφο B.1.3). Έτσι, η ενεργότητα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας είναι το μέτρο της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF.

Τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τα παραπάνω πλασμίδια, λύθηκαν με 50 μl διαλύματος λύσης (Passive Lysis Buffer, περιέχεται στο kit Dual-Luciferase Reporter Assay System της Promega) και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση, προκειμένου να προκληθεί λύση τους. Το κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 14.000×g και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της

ενεργότητας της λουσιφεράσης. 20 μ l του υπερκειμένου αναμίχθηκαν με 20 μ l του αντιδραστηρίου LAR II (Luciferase Assay Reagent II), το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας και το παραγόμενο φως μετρήθηκε σε λουμινόμετρο (Turner design). Για τη μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα, στο ίδιο σωληνάκι προστέθηκαν 10 μ l του αντιδραστηρίου Stop & Glo 1 \times , το οποίο περιέχει το υπόστρωμα της *Renilla* λουσιφεράσης και γίνεται η δεύτερη μέτρηση. Το διάλυμα Stop & Glo σταματάει τη δράση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας και ταυτόχρονα παρέχει το υπόστρωμα για τη δράση της *Renilla* λουσιφεράσης. Η κανονικοποιημένη μεταγραφική ενεργότητα των HIF είναι ο λόγος ενεργότητα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας / ενεργότητα της *Renilla* λουσιφεράσης.

B.2.20 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του

Για την απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZol (Macherey-Nagel). Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS 1x, και λύθηκαν με προσθήκη του NucleoZol, 400 μ l σε πιάτο 60mm. Το κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου και σε αυτό προστέθηκαν 160 μ l H₂O. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στα 12000xg, προκειμένου να διαχωριστεί το RNA από το DNA και το πρωτεϊνικό κλάσμα. Η υδατική φάση η οποία περιέχει το RNA, μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι, και σε αυτή προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Το μίγμα αναδεύτηκε ισχυρά και επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 12000xg, ώστε να κατακρημνιστεί το RNA. Αφού απομακρύνθηκε η υπερκείμενη ισοπροπανόλη, στο ίζημα προστέθηκαν 500 μ l 70% αιθανόλης, προκειμένου να ξεπλυθεί το κατακρημνισμένο RNA. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε απευθείας στα 12000xg για 3 λεπτά. Η πλύση επαναλήφθηκε δεύτερη φορά και στο τέλος η αιθανόλη αφαιρέθηκε πλήρως. Το ίζημα που αποτελεί το RNA, επαναιωρήθηκε σε 30 μ l αποστειρωμένου H₂O, απαλλαγμένου από RNAσες, ένζυμα που πέπτουν το RNA. Τα δείγματα διατηρούνται στους -80°C.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητάς του πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκη κύματος 260nm (A260) και 280nm (A280). Συγκεκριμένα, η ποσότητα του RNA προσδιορίζεται με βάση την απορρόφηση των νουκλεοτιδίων στα 260 nm στηριζόμενοι στο ότι διάλυμα RNA 40 μ g/ml έχει απορρόφηση 1 a.u. (absorbance units). Σε μήκος κύματος 280nm ελέγχεται εάν υπάρχει πρόσμιξη από

πρωτεΐνες που δεν απομακρύνθηκαν επαρκώς. Έτσι, ο λόγος των τιμών απορρόφησης που παρουσιάζει ένα διάλυμα RNA, A260/A280, αποτελεί μέτρο της καθαρότητάς του και των προσμίξεων από πρωτεΐνες που τυχόν συνυπάρχουν. Υψηλής καθαρότητας RNA με ελάχιστες προσμίξεις έχει λόγο που κυμαίνεται από 1,7 έως 2.

B.2.21 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time, qRT-PCR)

Η Real-Time PCR αποτελεί μία παραλλαγή της γνωστής αντίδρασης PCR. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση (ποιοτική και ποσοτική) της έκφρασης γονιδίων και συγκεκριμένα για τη μέτρηση των επιπέδων mRNA των υπό μελέτη γονιδίων. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η μετατροπή του mRNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα όπως περιγράφηκε παραπάνω, σε μόρια DNA. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης για τη σύνθεση αντιγράφων cDNA από εκμαγείο mRNA, και εφαρμόστηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

✓ Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με το PrimeScript RT reagent kit (Takara). Η αντίδραση διαμορφώθηκε σε τελικό όγκο 20 μ l ως εξής:

- ☐ 1 μ g template mRNA
- ☐ 4 μ l RT Buffer (5x)
- ☐ 1 μ l oligo dT primers (25 pmol)
- ☐ 1 μ l τυχαίων εκκινητών (50 pmol)
- ☐ 1 μ l ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης
- ☐ H₂O απαλλαγμένο από RNAses

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με βάση τις συνθήκες που ανέφερε το kit. Το προϊόν της αντίδρασης κατόπιν αραιώθηκε 1/5 με την προσθήκη 80 μ l ddH₂O. Το cDNA διατηρήθηκε στους -20°C.

✓ Real-Time PCR

Για την ανίχνευση του δίκλωνου DNA που παράχθηκε κατά τη διάρκεια της αντίδρασης RT-PCR, εφαρμόστηκε η μέθοδος των φθορίζουσών χρωστικών με τη χρήση της φθορίζουσας SYBR Green. Η SYBR Green δεσμεύεται κατά προτίμηση στο δίκλωνο DNA, και το σύμπλοκο DNA-SYBR Green εκπέμπει ακτινοβολία (λ_{em} =520 nm) μετά από διέγερση.

Αντίθετα, τα ελεύθερα μόρια του SYBR Green δεν παρουσιάζουν φθορισμό. Έτσι, κατά τη διάρκεια του σταδίου επιμήκυνσης του DNA στην αντίδραση της RT-PCR, με τη δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA αυξάνονται τα μόρια της χρωστικής που δεσμεύονται στο DNA, με αποτέλεσμα την αύξηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας. Οι αντιδράσεις της ποσοτικής Real-Time PCR πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή LightCycler 96 (Roche Life Science) χρησιμοποιώντας το KAPA SYBR FAST qPCR (Takara). Για την ενίσχυση των υπό εξέταση γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα ζεύγη εκκινητών, όπως αναγράφονται στην παράγραφο B.1.4. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ειδικά πιάτα 96 θέσεων, σε τελικό όγκο 10 μ l. Εκτός από τους εκκινητές και τη χρωστική SYBR, περιλάμβαναν 1 μ l του αραιωμένου cDNA ως εκμαγείο και ddH₂O. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών ήταν 0,5 μ M. Κάθε αντίδραση πραγματοποιείται εις διπλούν. Επίσης, ως δείγματα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα RNA, τα οποία δεν έχουν υποστεί αντίστροφη μεταγραφή (NRT), καθώς και δείγματα στα οποία αντί του cDNA προστέθηκε ως εκμαγείο H₂O (NTC). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 40 κύκλοι ενίσχυσης. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

- ☐ 2 min \rightarrow 50 °C Θερμική ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης
- ☐ 10 min \rightarrow 94 °C Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA

Κύκλοι:

- ☐ 15 sec \rightarrow 95 °C Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- ☐ 1 min \rightarrow 60 °C Υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση

Αριθμός κύκλων: 40

- ☐ 2 sec \rightarrow 60 °C Τελική επιμήκυνση

Με την τεχνική της qRT-PCR υπάρχει η δυνατότητα όχι μόνο της παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, αλλά και του προσδιορισμού της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού δείγματος με χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης, ενώ η σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζει το ρυθμό έκφρασης σε σχέση με την παραγωγή mRNA του κυττάρου. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Με τη σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζονται οι αλλαγές των επιπέδων του mRNA ενός γονιδίου, σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης ενός εσωτερικού γονιδίου αναφοράς. Στην εργασία αυτή, ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια της β -ακτίνης και της ριβοσωμική

υπομονάδας 18S. Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στο λόγο των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-στόχου προς το γονίδιο αναφοράς στην ίδια συνθήκη. Για το υπολογισμό αυτού του λόγου έχει εφαρμοσθεί το μαθηματικό μοντέλο του $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Η μέθοδος του $2^{-\Delta\Delta Ct}$, που έχει και την πιο ευρεία χρήση, είναι κατάλληλη για αντιδράσεις με παρεμφερή τιμή απόδοσης (efficiency, E), καθώς δεν περιλαμβάνει εξομάλυνση των αποδόσεων. Οι λόγοι έκφρασης υπολογίζονται από την εξίσωση: $R = 2^{-(\Delta Ct \text{ δείγμα} - \Delta Ct \text{ μάρτυρας})}$ (282).

B.2.22 Δοκιμασία επούλωσης τραύματος (wound healing assay)

Η ικανότητα μετανάστευσης αποτελεί μια σημαντική βιολογική λειτουργία των καρκινικών κυττάρων, που τους επιτρέπει να μετακινούνται και να δημιουργούν νέες μεταστατικές εστίες. Η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων μελετήθηκε εφαρμόζοντας τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος (283).

Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας των 6 πηγαδιών και αναπτύχθηκαν μέχρι να σχηματιστεί πλήρως μια μονοστοιβάδα. Στη συνέχεια, στην κυτταρική μονοστοιβάδα δημιουργήθηκε μια "πληγή", αποξαινώντας με την άκρη ενός ρύγχους σε ευθεία γραμμή τα κύτταρα, σχηματίζοντας μια κενή περιοχή. Τα κύτταρα που αποκολλήθηκαν, απομακρύνθηκαν μετά από πλύση με PBS και προστέθηκε θρεπτικό μέσο DMEM που περιείχε 1% FBS. Με τον τρόπο αυτό δεν ευνοείται ο πολλαπλασιασμός, αλλά η μετακίνηση των ήδη υπαρχόντων κυττάρων προς την ελεύθερη περιοχή. Επάνω σε αυτή την ευθεία σημειώθηκαν 5 σημεία, τα οποία αποτέλεσαν σημεία αναφοράς, προκειμένου σε αυτά να παρατηρείται η πορεία της μετανάστευσης των κυττάρων σε διάφορες χρονικές στιγμές. Τα κύτταρα, εφόσον υπέστησαν την επιθυμητή κατεργασία, αφέθηκαν να μεταναστεύσουν μέσα στην κενή επιφάνεια για 48 ώρες. Οι εικόνες ελήφθησαν στα χρονικά σημεία των 0, 24 και 48 ωρών, με ένα μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης εξοπλισμένο με κάμερα Leica DFC480. Η μέτρηση της ελεύθερης επιφάνειας σε κάθε χρονική στιγμή έγινε με το λογισμικό ImageJ.

B.2.23 Δοκιμασία κλωνογονικότητας (clonogenic assay)

Η ικανότητα ενός μεμονωμένου κυττάρου να παράγει πολλούς «απογόνους» και να αναπτύσσει μια μεγάλη αποικία που είναι εμφανής με γυμνό μάτι, αποδεικνύει ότι το κύτταρο αυτό έχει διατηρήσει την ικανότητα αναπαραγωγής του και αναφέρεται ως "κλωνογόνο". Διάφοροι μηχανισμοί έχουν περιγραφεί για τον κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, η απώλεια της αναπαραγωγικής ακεραιότητας και η αδυναμία πολλαπλασιασμού επ' αόριστον, είναι κοινά χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου. Επομένως, ένα κύτταρο που διατηρεί την ικανότητά του να συνθέτει πρωτεΐνες και DNA και μπορεί να πραγματοποιεί μία ή δύο μιτώσεις, αλλά

δεν είναι σε θέση να διαιρεθεί περαιτέρω και να παραγάγει ένα μεγάλο αριθμό θυγατρικών κυττάρων, θεωρείται «νεκρό». Αυτό πολύ συχνά αναφέρεται ως απώλεια της αναπαραγωγικής ακεραιότητας ή αναπαραγωγικός θάνατος. Ο προσδιορισμός της αναπαραγωγικής ικανότητας των κυττάρων χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο της επίδρασης διαφόρων παραγόντων (ακτινοβολίας, χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και άλλων) στην απώλεια αυτής της ικανότητας (284).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, διερευνήθηκε η επίδραση των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στην ικανότητα αυτή των καρκινικών κυττάρων Huh7. Για το σκοπό αυτό, έγινε αιώρηση 6000 κυττάρων Huh7 σε θρεπτικό μέσο, ώστε να προσκολληθούν ως μοναδικά κύτταρα και αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε πιάτα καλλιέργειας των 60 mm για 7 ημέρες, υπό κανονικές ή υποξικές συνθήκες. Μετά την παρέλευση της περιόδου επώασης, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με 100% μεθανόλη για 10 λεπτά στους -20°C . Στη συνέχεια, έγινε χρώση τους με τη χρωστική Crystal Violet (0,5% χρωστικής σε 25% μεθανόλη). Τα κύτταρα επώαστηκαν με τη χρωστική για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνθηκε με 2 πλύσεις με H_2O . Προκειμένου να είναι μια αποικία ορατή μετά τη χρώση, θα πρέπει να αποτελείται από 50 τουλάχιστον κύτταρα. Από κάθε πιάτο καλλιέργειας ελήφθησαν φωτογραφίες και με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων ImageJ πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του αριθμού των αποικιών και των επιφανειών που αυτές καταλαμβάνουν.

B.2.24 Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων Huh7. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας των 96 θέσεων (1000 κύτταρα/θέση) και κατεργάστηκαν για 72 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το «CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay» κιτ (Promega). Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο που επιτρέπει τον προσδιορισμό του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Στα μεταβολικά δραστήρια κύτταρα, μιτοχονδριακές αναγωγάσες μετατρέπουν (ανάγουν) την κίτρινη τετραζόλη MTT σε ένα έγχρωμο (μωβ) προϊόν, τη φορμαζάνη. Η απορρόφηση της τελευταίας μετρείται στα 490 nm, και εκφράζει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Το MTT προστέθηκε στα κύτταρα σε αναλογία 1:1 με το θρεπτικό μέσο (20 μl MTT και 20 μl DMEM ανά πηγάδι) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά στο σκοτάδι, πριν τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης. Η

μέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων έγινε κάθε 24 ώρες. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σε κάθε περίπτωση συγκρίθηκε με την συνθήκη ελέγχου.

B.2.25 Μέτρηση κυτταρικού θανάτου

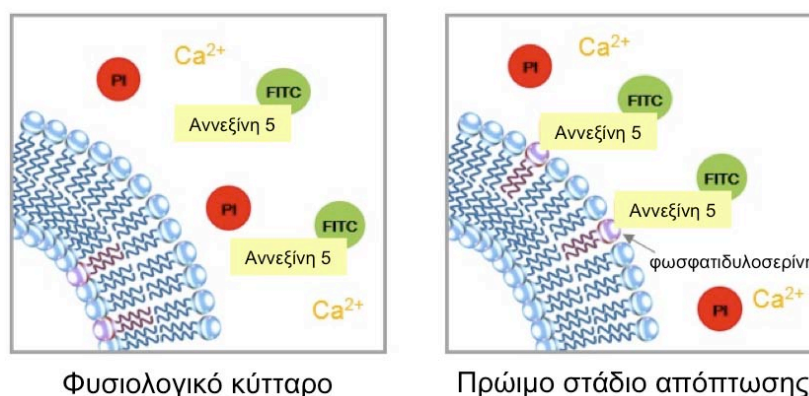
Για τον προσδιορισμό του κυτταρικού θανάτου μετά από επίδραση των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG, τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας των 96 θέσεων (2000 κύτταρα / θέση), με θρεπτικό μέσο DMEM που περιέχει 1% FBS. Χρησιμοποιήθηκε το «LDH Cytotoxicity Detection kit» (Takara Clontech), που βασίζεται σε μια χρωματομετρική μέθοδο η οποία μετρά την ενεργότητα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH). Το ένζυμο αυτό που φυσιολογικά είναι κυτταροπλασματικό, απελευθερώνεται στο υπερκείμενο της καλλιέργειας εξαιτίας της καταστροφής των κυττάρων που έχουν πεθάνει. Η δράση της LDH έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή του NAD^+ σε NADH, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την ενζυμική μετατροπή του τετραζολίου σε φορμαζάνη. Το αντιδραστήριο προστίθεται στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μισή ώρα πριν τη μέτρηση, σε αναλογία 1:1 και το χρώμα που αναπτύσσεται μετρείται 490 nm. Η απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη με τον κυτταρικό θάνατο, ο οποίος εκφράστηκε ως ποσοστό %. Ως 100% του κυτταρικού θανάτου θεωρήθηκε η απορρόφηση της συνθήκης όπου τα κύτταρα λύθηκαν με 2% Triton X -100 (σε DMEM με 1% FBS) για 15 λεπτά, πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 48 ώρες, ενώ η μέτρηση του κυτταρικού θανάτου πραγματοποιήθηκε στις 0, 24 και 48 ώρες.

B.2.26 Μελέτη της αποδιοργάνωσης της κυτταρικής μεμβράνης (Annexin V assay)

Μια από τις τροποποιήσεις που υφίστανται τα αποπτωτικά κύτταρα είναι η αναδιοργάνωση της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης και η απώλεια της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας της (285). Το γεγονός αυτό αποτελεί πρώιμο στάδιο της απόπτωσης και θεωρείται αντιστρεπτό. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο αυτό εκφράζουν κάποιους δείκτες/μάρτυρες στην κυτταρική τους επιφάνεια, που οδηγούν στην πρώιμη αναγνώριση τους από γειτονικά κύτταρα, με σκοπό να φαγοκυτταρωθούν. Ένα από τα γεγονότα τα οποία σχετίζονται με την απώλεια της ασυμμετρίας της μεμβράνης είναι η μετακίνηση της φωσφατιδυλοσερίνης από την εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη προς τον εξωκυττάριο χώρο.

Προκειμένου να ελεγχθεί αν τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG επάγουν το φαινόμενο αυτό, κύτταρα Huh7 αναπύχθηκαν σε καλυπτρίδες και επώαστηκαν για 24h σε συνθήκες υποξίας. Κατόπιν, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με 3% φορμαλδεΰδη για 5

λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη σήμανση των θέσεων της μεμβράνης που έχουν τροποποιηθεί, εφαρμόστηκε μια μέθοδος που χρησιμοποιεί την αννεξίνη 5 (Εικόνα 39), μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά ισχυρά και ειδικά με τα κατάλοιπα φωσφατυδυλοσερίνης, συζευγμένη με μια φθορίζουσα χρωστική (Annexin V, CFTM555 Conjugate, Biotium). Έτσι, μετά τη μονιμοποίησή τους, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (annexin V binding buffer) και στη συνέχεια επώαστηκαν για 30 λεπτά με 2,5 µg/ml αννεξίνης 5 στο σκοτάδι. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια έγινε επώαση των καλυπτρίδων για 5 λεπτά με DAPI (10mg σε annexin V binding buffer), για χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Η παρατήρηση του φθορισμού της αννεξίνης 5 έγινε στα 564 nm. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με τον φακό 20x και στη συνέχεια μετρήθηκαν για κάθε συνθήκη περισσότερα από 200 κύτταρα. Ο αριθμός των κυττάρων που φθορίζουν μετά από επώαση με την αννεξίνη 5 εκφράστηκε ως ποσοστό του συνολικού αριθμού κυττάρων.



Εικόνα 39: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ανίχνευσης της φωσφατυδυλοσερίνης που εκτίθεται στην εξωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη των αποπτωτικών κυττάρων, με σημασμένη αννεξίνη 5.

B.2.27 Μέτρηση της ενεργότητας των εκτελεστικών κασπασών 3 και 7

Το βασικό χαρακτηριστικό του μονοπατιού της απόπτωσης είναι η ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών 3 και 7. Οι κασπάσες αυτές ανήκουν σε μια οικογένεια ειδικών πρωτεασών κυστεΐνης και ασπαρτικού οξέος. Ενεργοποιούνται πρωτεολυτικά και παίζουν καθοριστικό ρόλο τελεστών στην απόπτωση των κυττάρων. Εφόσον ενεργοποιηθεί ο καταρράκτης των κασπασών, η διαδικασία της απόπτωσης είναι μη αναστρέψιμη (285).

Η δραστηριότητα των κασπασών 3 και 7 μετρήθηκε με το kit "Caspase-Glo[®] 3/7 Assay" (Promega), το οποίο χρησιμοποιεί μια μέθοδο προσδιορισμού φωταύγειας. Το kit περιέχει ένα φωτογόνο υπόστρωμα των κασπασών 3 και 7 που φέρει το τετραπεπτίδιο που

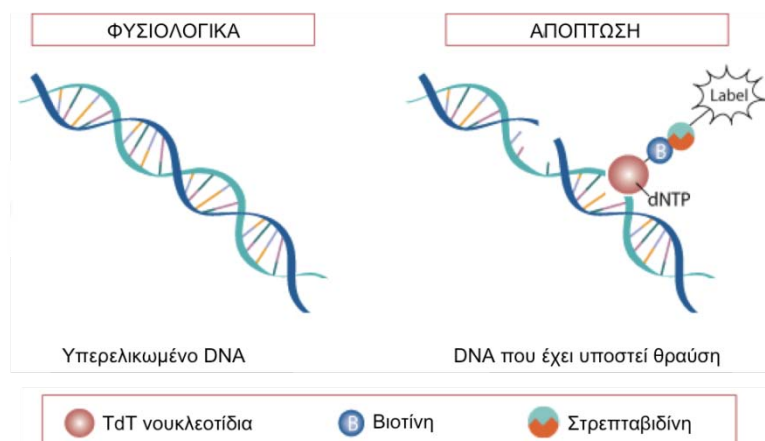
αναγνωρίζουν και πέπτουν οι κασπάσες. Έτσι, στο τέλος της αντίδρασης εκλύεται φως, το οποίο είναι ευθέως ανάλογο με τη δράση των κασπασών αυτών. Τα κύτταρα Huh7 επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 θέσεων (1000 κύτταρα / θέση) και επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG, σε νορμοξία και υποξία. Η μέτρηση της ενεργότητας των κασπασών πραγματοποιήθηκε στις 0, 24 και 48 ώρες. Για το σκοπό αυτό, στα κύτταρα προστέθηκε το αντιδραστήριο του kit σε αναλογία 1:1 με το θρεπτικό μέσο και επώαστηκε για 1 ώρα. Το αντιδραστήριο αυτό προκάλεσε τη λύση των κυττάρων, με αποτέλεσμα οι εκτελεστικές κασπάσες που υπήρχαν στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που εισήλθαν σε διαδικασία απόπτωσης, να απελευθερωθούν στο υπερκείμενο και να πέσουν το υπόστρωμά τους, που υπήρχε επίσης στο αντιδραστήριο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός προϊόντος που αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου λουσιφεράση, η οποία περιέχεται στο ίδιο αντιδραστήριο. Από την αντίδραση της λουσιφεράσης παράχθηκε φως, το οποίο μετρήθηκε σε λουμινόμετρο.

B.2.28 Μελέτη της βλάβης του DNA (TUNEL assay - terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

Τελικό στάδιο της απόπτωσης αποτελεί η θραύση της χρωματίνης (285). Για να ανιχνευτούν τα κύτταρα που έχουν εισέλθει σε αυτό το στάδιο, χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος (*In situ* Apoptosis Detection Kit, Takara) που στηρίζεται στην εισαγωγή σημασμένων με φθορίζουσα χρωστική dNTPs στα ελεύθερα 3'-OH άκρα που έχουν προκύψει από τη θραύση του DNA στα αποπτωτικά κύτταρα, επιτρέποντας την άμεση παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο φθορισμού. Αυτό διαμεσολαβείται από το ένζυμο Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) (Εικόνα 40).

Έτσι, κύτταρα Huh7 αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες και επώαστηκαν για 24 ώρες παρουσία των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG, σε συνθήκες υποξίας. Κατόπιν, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με 3% φορμαλδεΰδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κάθε καλυπτρίδα 100 µl διαλύματος που καθιστά διαπερατές τις μεμβράνες (παρέχεται από το kit) και έγινε επώαση για 5 λεπτά στον πάγο. Το στάδιο αυτό διασφαλίζει την διείσδυση του ενζύμου TdT στα κύτταρα. Ακολούθως, σε κάθε καλυπτρίδα προστέθηκαν 50 µl από το μέσο επισήμανσης, αποτελούμενο από 5 µl ενζύμου TdT και 45 µl διαλύματος επισήμανσης (labeling safe buffer). Το μέσο επισήμανσης παρασκευάστηκε λίγο πριν τη χρήση και διατηρήθηκε σε πάγο. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το μέσο επισήμανσης για 60 λεπτά στους 37°C. Μετά το τέλος της επώασης, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και σταθεροποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρο

πλάκα με Mowiol και DAPI, και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τα σημασμένα dNTPs φθορίζουν στα 525 nm. Για κάθε συνθήκη μετρήθηκαν περισσότερα από 200 κύτταρα. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο τελικό στάδιο της απόπτωσης και εμφάνισαν φθορισμό μετά την επώαση με το ένζυμο TdT και τα σημασμένα dNTPs, εκφράστηκαν ως ποσοστό % του συνολικού αριθμού των κυττάρων.



Εικόνα 40: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου TUNEL, για την ανίχνευση της θραύσης του DNA στα αποπτωτικά κύτταρα.

B.2.29 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism ver.5.04. Διαφορές ανάμεσα σε δύο ομάδες ελέγχθηκαν με το Student's t-test, έλεγχος πολλαπλών ομάδων έγινε με το ANOVA test. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm την τυπική απόκλιση (SD) ή το τυπικό σφάλμα (SEM). Τα στατιστικά σημαντικά όρια είναι *** $p < 0,001$, ** $p < 0,001$ και * $p < 0,05$.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ HIF-α

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (παράγραφος Α.3.2.3), η αυπομονάδα των HIF υπόκειται σε διάφορες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, με πιο μελετημένη τη φωσφορυλίωση. Έχουν περιγραφεί τόσο ανασταλτικές, όσο και ενεργοποιητικές φωσφορυλιώσεις, που μεταβάλλουν τη σταθερότητα και την ενεργοποίηση των HIF-α. Παρόλο που διάφορες κινάσες, μεταξύ των οποίων οι ERK1/2 και CK1δ, είναι γνωστό ότι φωσφορυλιώνουν και ρυθμίζουν τους HIF-α, οι φωσφατάσες που επηρεάζουν τη δράση των HIF παραμένουν μέχρι τώρα άγνωστες. Στην παρούσα διατριβή θελήσαμε να διερευνήσουμε την ύπαρξη φωσφατασών που ρυθμίζουν τους HIF-α, άμεσα ή έμμεσα, και μεταβάλλουν τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF σε συνθήκες υποξίας.

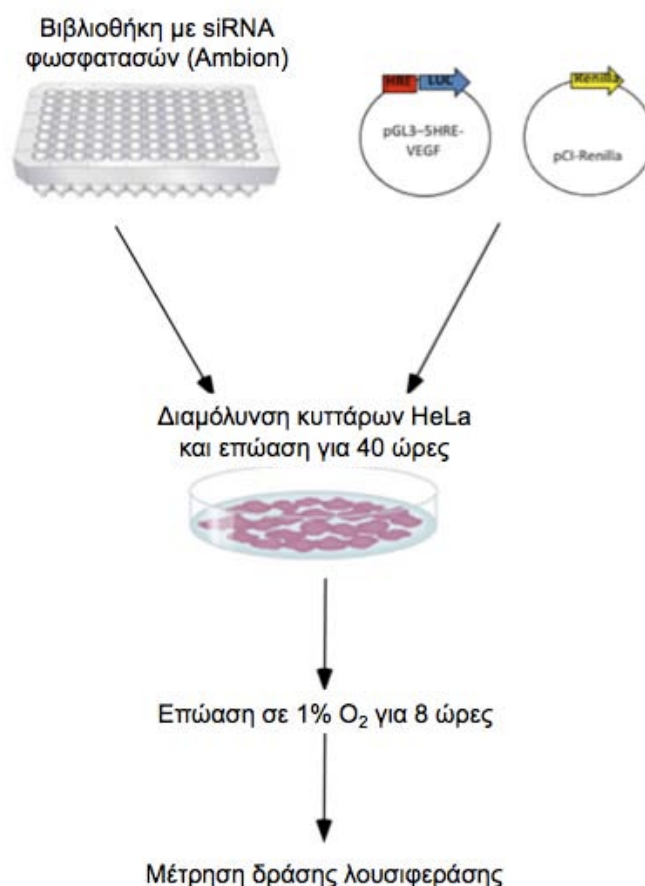
Γ.1.1 Ταυτοποίηση φωσφατασών που επηρεάζουν τη δράση των HIF σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα

Προκειμένου να εντοπιστούν νέοι ρυθμιστές της δράσης των HIF και του μονοπατιού της υποξίας, εξετάστηκε η επίδραση της αποσιώπησης ενός ικανοποιητικού αριθμού φωσφατασών στη ρύθμιση της δράσης των HIF. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια δοκιμασία διαλογής (screen) φωσφατασών, χρησιμοποιώντας μία βιβλιοθήκη που περιέχει τρία διαφορετικά siRNA για όλες τις γνωστές ανθρώπινες φωσφατάσες (Ambion Silencer® Select). Δεδομένου ότι οι HIF-1α και HIF-2α φωσφορυλιώνονται κυρίως σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης, επιλέχθηκαν για τη διαδικασία διαλογής μόνο τα siRNA που αποσιωπούν την έκφραση των καταλυτικών υπομονάδων 25 φωσφατασών που ανήκουν στην κατηγορία των φωσφατασών σερίνης-θρεονίνης ή διπλής εξειδίκευσης (Πίνακας 7). Έτσι, σε κύτταρα HeLa, αποσιωπήθηκαν μεμονωμένα οι συγκεκριμένες φωσφατάσες, χρησιμοποιώντας τα τρία διαφορετικά siRNA για την καθεμία.

Πίνακας 7: Ο πίνακας παρουσιάζει τις 25 καταλυτικές υπομονάδες των ανθρώπινων φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης ή διπλής εξειδίκευσης που εξετάστηκαν στη δοκιμασία διαλογής, για την επίδρασή τους στη δράση των HIF σε συνθήκες υποξίας. Η βιβλιοθήκη siRNA Ambion Silencer® Select περιείχε τρία διαφορετικά siRNA για την κάθε φωσφατάση.

Σύμβολο γονιδίου	Αριθμός αναγνώρισης	Πλήρες όνομα γονιδίου
DUSP1	NM_004417	dual specificity phosphatase 1
DUSP2	NM_004418	dual specificity phosphatase 2
DUSP4	NM_001394	dual specificity phosphatase 4
DUSP5	NM_004419	dual specificity phosphatase 5
DUSP6	NM_001946	dual specificity phosphatase 6
DUSP7	NM_001947	dual specificity phosphatase 7
DUSP8	NM_004420	dual specificity phosphatase 8
DUSP9	NM_001395	dual specificity phosphatase 9
DUSP10	NM_007207	dual specificity phosphatase 10
DUSP16	NM_030640	dual specificity phosphatase 16
PPP1CA	NM_001008709	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform
PPP1CB	NM_002709	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform
PPP1CC	NM_002710	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform
PPP2CA	NM_002715	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform
PPP2CB	NM_001009552	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform
PPP3CA	NM_000944	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform
PPP3CB	NM_021132	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, beta isoform
PPP3CC	NM_005605	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, gamma isoform
PPP4C	NM_002720	protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit
PPP5C	NM_006247	protein phosphatase 5, catalytic subunit
PPP6C	NM_002721	protein phosphatase 6, catalytic subunit
PPM2C	NM_018444	protein phosphatase 2C, magnesium-dependent, catalytic subunit
PDP2	NM_020786	pyruvate dehydrogenase phosphatase isoenzyme 2
PPEF2	NM_006239	protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 2
PPEF1	NM_152226	protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 1

Προκειμένου να μετρηθεί η μεταγραφική ενεργότητα των HIF σε συνθήκες υποξίας, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με το siRNA και τα πλασμίδια αναφοράς που εκφράζουν τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που περιέχει 5 HRE (στοιχείων απόκρισης στην υποξία) και τη Renilla λουσιφεράση (παράγραφος B.1.3), (Εικόνα 41). Έπειτα από επώαση 40 ωρών τα κύτταρα επώαστηκαν δώρες σε νορμοξία ή υποξία και ακολούθησε ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων και μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας με δοκιμασία λουσιφεράσης.



Εικόνα 41: Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας διαλογής των φωσφατασών που επηρεάζουν τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF στην υποξία με πειράματα αποσιώπησης. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το siRNA των φωσφατασών του πίνακα 3 σε συνδυασμό με τα πλασμιδία pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pCL-Renilla για 40 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) για 8 ώρες και μετρήθηκε η δράση της λουσιφεράσης.

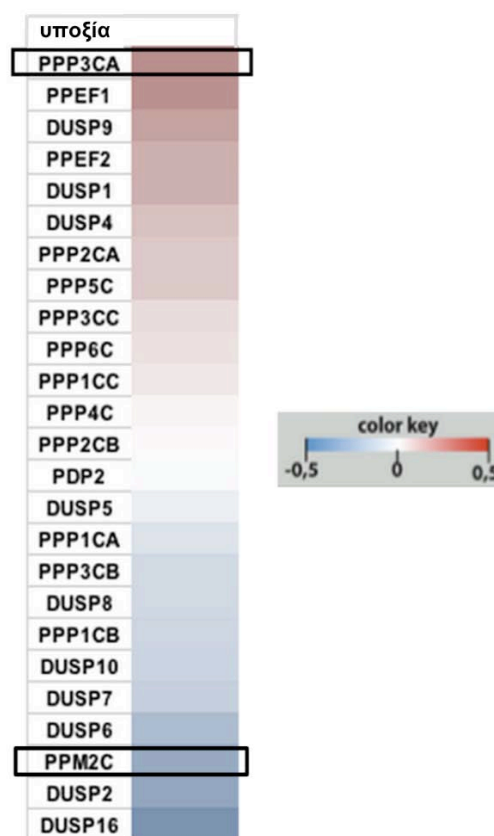
Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας διαλογής παρουσιάζονται στον πίνακα 8 και στο χρωματικό χάρτη της εικόνας 42. Στον πίνακα φαίνονται οι τιμές για κάθε siRNA που χρησιμοποιήθηκε έναντι των 25 φωσφατασών. Ως 1 χαρακτηρίστηκε η επαγωγή της δράσης των HIF από την υποξία μετά από διαμόλυνση με το κοντρόλ siRNA, που αποτέλεσε και το θετικό κοντρόλ του πειράματος.

Διαπιστώθηκε ότι οι φωσφατάσες που μελετήθηκαν επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τους HIF. Κάποιες επηρέασαν είτε θετικά, είτε αρνητικά τη δράση των HIF στην υποξία, ενώ κάποιες άλλες δεν τη μετέβαλαν σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα, με την αποσιώπηση αρκετών φωσφατασών, όπως των PPP3CA, PPEF1 και DUSP9, ενισχύθηκε σημαντικά η μεταγραφική ενεργότητα των HIF σε υποξία (Εικόνα 42, κόκκινο χρώμα). Τα δεδομένα αυτά υπέδειξαν πως η απουσία συγκεκριμένων φωσφατασών οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF, μέσω άμεσης ή έμμεσης δράσης τους στους HIF-α.

Πίνακας 8: Ο πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας διαλογής για τα τρία διαφορετικά siRNA της κάθε φωσφατάσης, τους μέσους όρους των τριών πειραμάτων και το log10 των τιμών του μέσου όρου. Σε ελάχιστες περιπτώσεις ο μέσος όρος προέκυψε από δύο διαφορετικά πειράματα siRNA.

	siRNA - A	siRNA - B	siRNA - C	Μέσος όρος	log ₁₀
HYPO CTR	1	1	1	1	0
DUSP16	0,605		0,664	0,635	-0,197
DUSP2	0,573	0,701	0,879	0,718	-0,144
PPM2C	1,190	0,526	0,365	0,694	-0,159
DUSP6	0,520	0,600	1,358	0,826	-0,083
DUSP7	0,595	0,671	1,407	0,891	-0,050
DUSP10	1,044	0,540	0,708	0,764	-0,117
PPP1CB	0,812	0,378	1,348	0,846	-0,073
DUSP8	0,264	1,544	1,324	1,044	0,019
PPP3CB	0,770	0,454	1,413	0,879	-0,056
PPP1CA	0,755	0,661	1,376	0,931	-0,031
PDP2	1,129	0,694		0,911	-0,040
DUSP5	0,939	0,568	1,314	0,940	-0,027
PPP2CB	1,099	0,873	1,086	1,019	0,008
PPP4C	0,398	1,894	1,438	1,244	0,095
PPP1CC	0,760	1,322	1,495	1,192	0,076
PPP6C	0,860		1,598	1,229	0,090
PPP3CC	1,294	0,532	1,388	1,072	0,030
PPP5C	0,753	1,953	0,913	1,206	0,081
PPP2CA	1,367	0,887		1,127	0,052
DUSP4	1,095	0,534	2,235	1,288	0,110
DUSP1	1,416	0,738	1,782	1,312	0,118
PPEF2	1,132	1,192	1,615	1,313	0,118
DUSP9	1,250	1,644	1,242	1,379	0,139
PPEF1	1,583	1,142	1,665	1,463	0,165
PPP3CA	1,232	0,715	2,483	1,476	0,169

Αντίθετα, η αποσιώπηση κάποιων άλλων φωσφατασών, όπως των DUSP16, DUSP2 και PPM2C, προκάλεσε σημαντική μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF (Εικόνα 42, μπλε χρώμα). Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αποσιώπησης υπέδειξαν ότι υπάρχουν φωσφατάσες που η δράση τους μπορεί να έχει είτε θετική ή αρνητική επίδραση στην ενεργότητα των HIF.



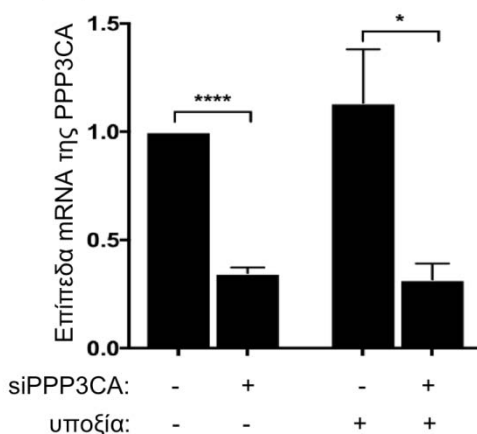
Εικόνα 42: Μεταγραφική ενεργότητα των HIF κατά την αποσιώπηση διαφόρων φωσφατάσων στην υποξία. Χρωματικός χάρτης που απεικονίζει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας διαλογής, εκφρασμένα ως \log_{10} του μέσου όρου τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Η κανονικοποίηση έγινε ως προς το θετικό κοντρόλ (κοντρόλ siRNA, $\log_{10}=0$ λευκό χρώμα στον χάρτη). Τα κύτταρα σε νορμοξία διαμολυσμένα με κοντρόλ siRNA, αποτέλεσαν το αρνητικό κοντρόλ. Με πλαίσιο επισημαίνονται οι φωσφατάσες που επιλέχθηκαν για να μελετηθεί διεξοδικά η επίδραση τους στη ρύθμιση των HIF (PPP3CA, PPM2C).

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης επιλέχθηκαν για διεξοδικότερη διερεύνηση οι καταλυτικές υπομονάδες των δύο φωσφατάσων σερίνης/θρεονίνης που εμφάνισαν την ισχυρότερη επίδραση στη δραστικότητα των HIF σε συνθήκες υποξίας: η καλσινευρίνη (PPP3CA ή CnA), η αποσιώπηση της οποίας προκάλεσε τη μεγαλύτερη παρατηρούμενη αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF, και η φωσφατάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PPM2C ή PDP1), η απουσία της οποίας προκάλεσε τη μεγαλύτερη μείωση της δράσης των HIF.

Γ.1.2 Διερεύνηση του ρόλου της καλσινευρίνης (PPP3CA) στη ρύθμιση των HIF

Γ.1.2.1 Μελέτη της αποσιώπησης της PPP3CA στην ενεργότητα των HIF

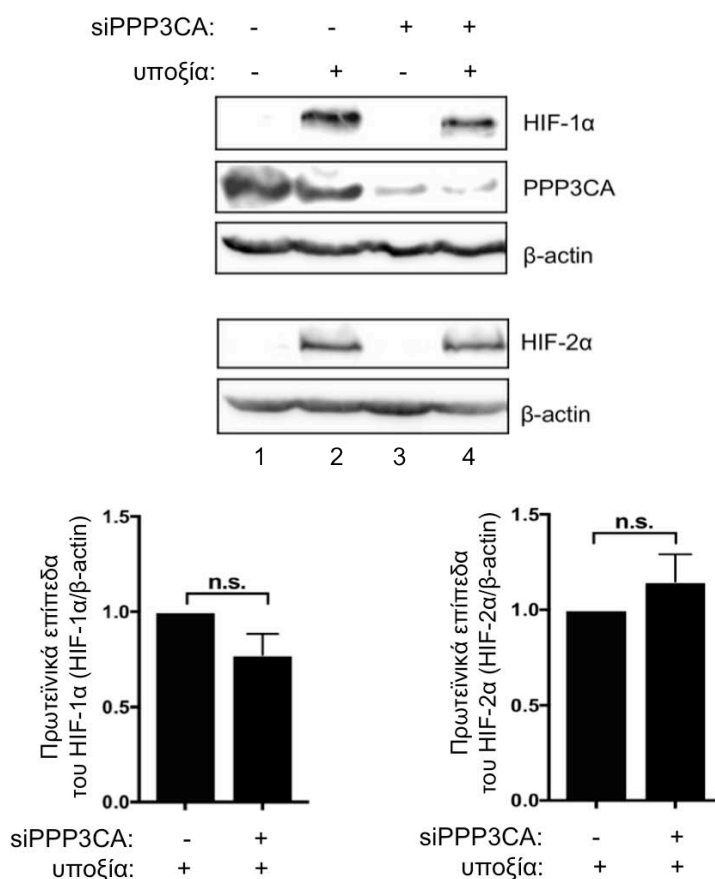
Για την επιβεβαίωση της επίδρασης της αποσιώπησης της φωσφατάσης PPP3CA στην ενεργότητα των HIF σε συνθήκες υποξίας, χρησιμοποιήθηκε ένα διαφορετικό siRNA για τη συγκεκριμένη φωσφατάση, σε σχέση με τα siRNA της δοκιμασίας διαλογής. Αρχικά, ελέγχθηκε η ειδικότητα του νέου siRNA (Hs-PPP3CA-6, Qiagen) και η ικανότητά του να προκαλεί ικανοποιητικό ποσοστό αποσιώπησης της PPP3CA. Για το σκοπό αυτό μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA της φωσφατάσης με ποσοτική RT-PCR, μετά από διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων με κοντρολ siRNA ή με siRNA έναντι της PPP3CA σε νορμοξία και υποξία (Εικόνα 43), καθώς και τα πρωτεϊνικά της επίπεδα με ανοσοαποτύπωση κατά Western και κατάλληλο αντίσωμα ενάντια στην PPP3CA (Εικόνα 44).



Εικόνα 43: Αποσιώπηση της φωσφατάσης PPP3CA με το Hs-PPP3CA-6 siRNA. Μέτρηση των επιπέδων mRNA της φωσφατάσης PPP3CA με q-RT-PCR, σε κύτταρα HeLa τα οποία διαμολύνθηκαν με το siRNA της PPP3CA (+) ή με το κοντρολ siRNA (-) για 40 ώρες και ακολούθως επώαστηκαν για 8 ώρες σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂). Τα επίπεδα mRNA του 18S χρησιμοποιήθηκαν για την εξομάλυνση των αποτελεσμάτων (-/+ s.d., *: P<0.05, ****: P<0.0001).

Μετά από παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με το siRNA της PPP3CA, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA της φωσφατάσης, σε ποσοστό περίπου 80%, σε σχέση με την εκάστοτε συνθήκη αναφοράς, όπως προέκυψε από τρία ανεξάρτητα πειράματα (Εικόνα 43, στήλη 2 σε σχέση με στήλη 1 και στήλη 4 σε σχέση με στήλη 3). Επίσης, στα ίδια πειράματα,δείχθηκε ότι η PPP3CA δεν επάγεται από την υποξία, καθώς τα επίπεδα mRNA της δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά μεταξύ νορμοξίας

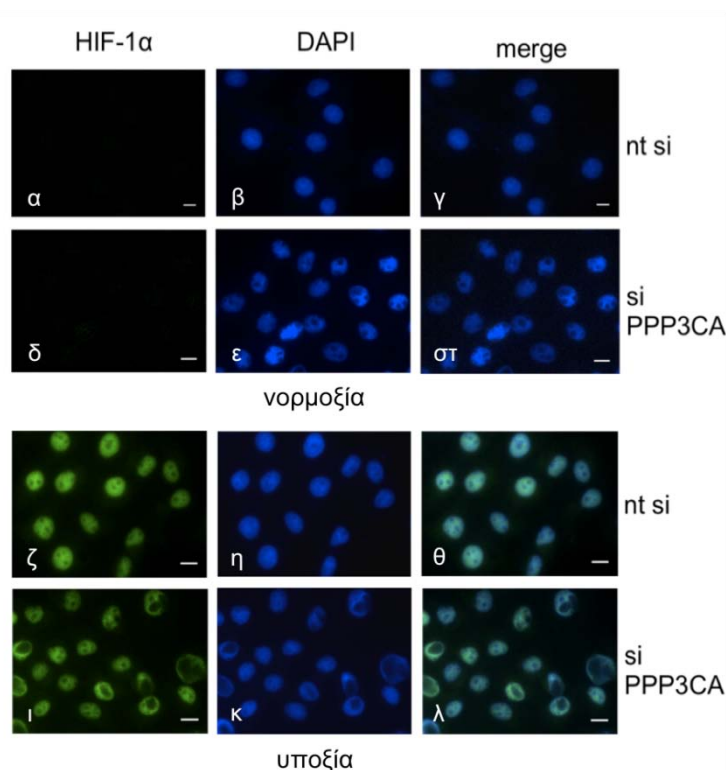
(στήλη 1) και υποξίας (στήλη 3) στις συνθήκες ελέγχου, που έχει γίνει επίδραση με το κοντρόλ siRNA.



Εικόνα 44: Η αποσιώπηση της PPP3CA δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών HIF-1α και HIF-2α στην υποξία. Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που διαμολύνθηκαν με το siRNA της PPP3CA (Hs-PPP3CA-6) και επώαστηκαν για 8 ώρες σε νορμοξία (21% O₂) και υποξία (1% O₂). (A) Πρωτεϊνικά επίπεδα HIF-1α, HIF-2α, PPP3CA, β-actin με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων ενάντια σε αυτές. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των HIF-1α και HIF-2α από τρία ανεξάρτητα πειράματα ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας τα επίπεδα της β-actin για την κανονικοποίηση (-/+ s.e.m., n.s.: μη σημαντική διαφορά).

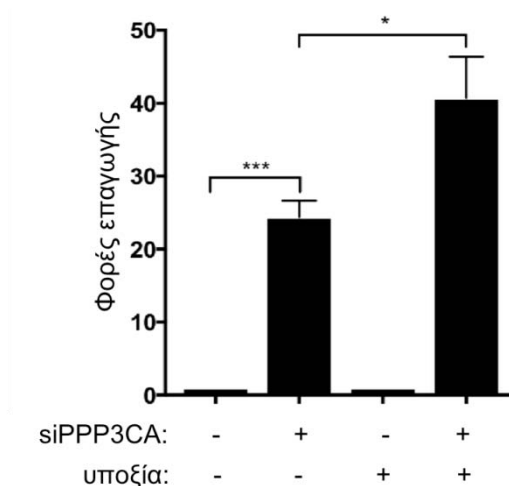
Η ικανοποιητική αποσιώπηση της PPP3CA έγινε εμφανής και από τη μείωση των πρωτεϊνικών της επιπέδων, μετά την επίδραση με το siRNA (Εικόνα 44, ανοσοαποτύπωση διαδρομές 3 και 4). Παρόλα αυτά, δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 44, ανοσοαποτύπωση διαδρομή 4 σε σχέση με διαδρομή 2), σύμφωνα με την ποσοτικοποίηση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης (Εικόνα 44, αντίστοιχα διαγράμματα).

Επιπλέον, πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η αποσιώπηση της PPP3CA δεν επηρέασε τον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α, ο οποίος παρέμεινε πυρηνικός σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 45, εικόνα ι σε σχέση με εικόνα ζ).



Εικόνα 45: Η αποσιώπηση της PPP3CA δε μεταβάλλει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α στην υποξία. Εικόνες μικροσκοπίου μετά από έμμεσο ανοσοφθορισμό, σε κύτταρα HeLa τα οποία διαμολύνθηκαν με το siRNA της PPP3CA ή με το κοντρολ siRNA για 40 ώρες και επώαστηκαν για 8 ώρες σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂). Στο πράσινο κανάλι εμφανίζεται ο HIF-1α, ενώ με DAPI έγινε η χρώση των πυρήνων. Η κλίμακα ορίστηκε στα 10 μM.

Μετά από ταυτόχρονη διαμόλυνση των κυττάρων HeLa με το siRNA της PPP3CA και τα πλασμίδια που εκφράζουν τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο των HIF και τη Renilla λουσιφεράση, παρατηρήθηκε ότι η αποσιώπηση της PPP3CA σε συνθήκες υποξίας, προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF (Εικόνα 46, στήλη 4 σε σχέση με στήλη 2), γεγονός που επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της δοκιμασίας διαλογής (Εικόνα 42).

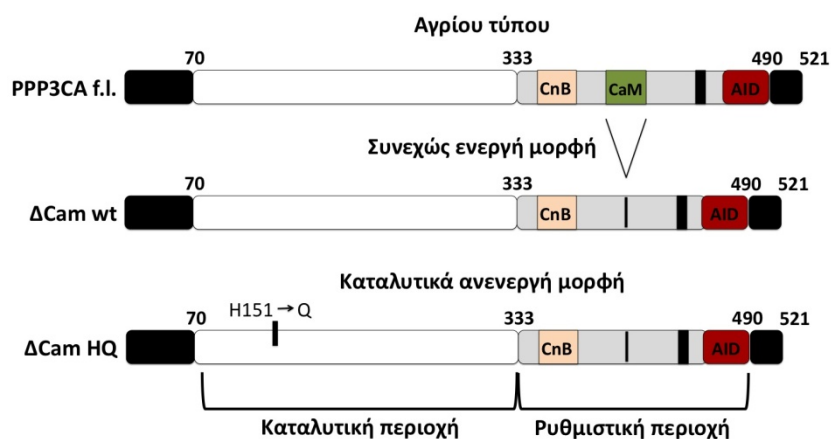


Εικόνα 46: Η αποσιώπηση της PPP3CA ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF στην υποξία. Μέτρηση της δράσης λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa που διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με το siRNA της PPP3CA (Hs-PPP3CA-6) ή το κοντρολ siRNA και τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pCL-Renilla για 40 ώρες και επώαστηκαν για 8 ώρες σε 21% O₂ ή 1% O₂. Η δράση λουσιφεράσης παρουσιάζεται ως φορές επαγωγής συγκρινόμενη με την αντίστοιχη νορμοξία (έχει οριστεί ως 1). Οι τιμές του διαγράμματος αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και σύνολο 9 τιμών (-/+ s.e.m., *: P<0.05, ***: P<0.001).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η PPP3CA μπορεί να ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποίηση των HIF, χωρίς όμως να επηρεάζει τη σταθερότητα και τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α.

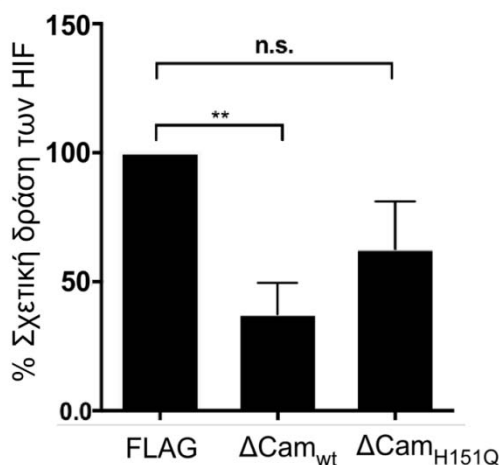
Γ.1.2.2 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης των διαφόρων μορφών της PPP3CA, στη ρύθμιση των HIF σε συνθήκες υποξίας

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αρνητική ρύθμιση του HIF από την PPP3CA, σε κύτταρα HeLa υπερεκφράστηκαν δύο μεταλλαγμένες μορφές της φωσφατάσης (Εικόνα 47), μια συνεχώς ενεργοποιημένη μορφή (FLAG-ΔCam wt) και μια καταλυτικά ανενεργή μορφή (FLAG-ΔCam H151Q), μαζί με τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης.



Εικόνα 47: Σχηματική απεικόνιση της αγρίου τύπου (60 kDa) και των μεταλλαγμένων μορφών (συνεχώς ενεργή και καταλυτικά ανενεργή ~55 kDa) της φωσφατάσης PPP3CA. Από τις δύο μεταλλαγμένες μορφές της PPP3CA απουσιάζει η περιοχή δέσμευσης της καλμοδουλίνης, ενώ στην καταλυτικά ανενεργή μορφή έχει αντικατασταθεί η ιστιδίνη της θέσης 151 με ασπαράγινη, καταστρέφοντας ένα δεσμό συναρμογής στο ενεργό κέντρο, αναστέλλοντας έτσι, τη δράση φωσφατάσης του ενζύμου.

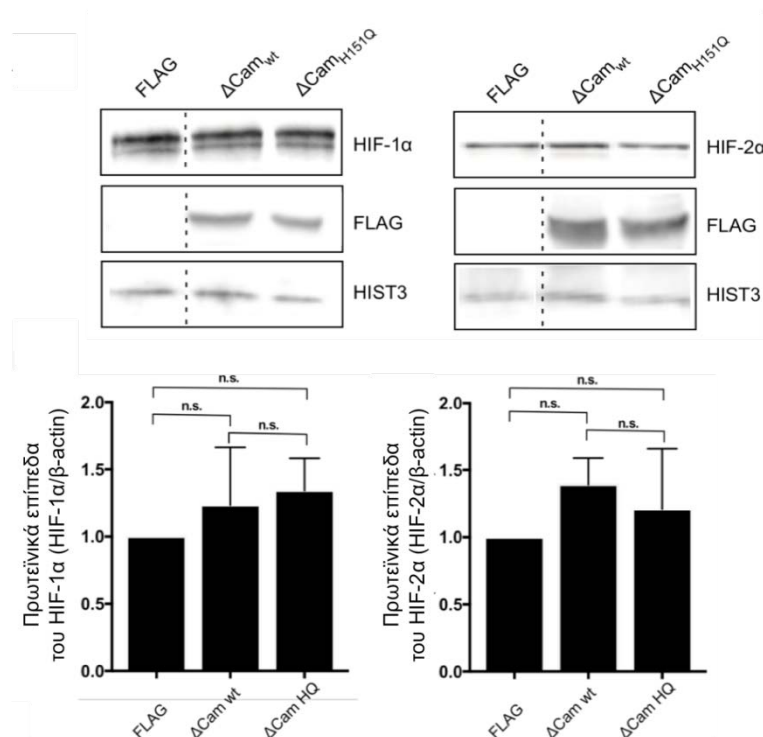
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 48, η έκφραση της συνεχώς ενεργοποιημένης μορφής της φωσφατάσης (στήλη 2) μείωσε σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF σε συνθήκες υποξίας. Αντίθετα, η υπερέκφραση της συνεχώς ανενεργής μορφή της PPP3CA (στήλη 3) δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στη δράση των HIF.



Εικόνα 48: Η καταλυτική δράση της PPP3CA απαιτείται για την αναστολή της εξαρτώμενης από τους HIF δράσης της λουσιφεράσης στην υποξία. Μέτρηση της δράσης λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa που διαμολύνθηκαν είτε με τον άδειο φορέα pCMV2-FLAG, ή με τις πλασμιδιακές κατασκευές που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της PPP3CA, και τα πλασμίδια pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pCL-Renilla, και 24 ώρες μετά επώαστηκαν για 8 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂). Η δράση λουσιφεράσης για κάθε συνθήκη υποξίας έχει κανονικοποιηθεί ως προς την αντίστοιχη νορμοξία, και παρουσιάζεται ως % σχετική δράση σε σχέση με το κοντρόλ της υποξίας (κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα =

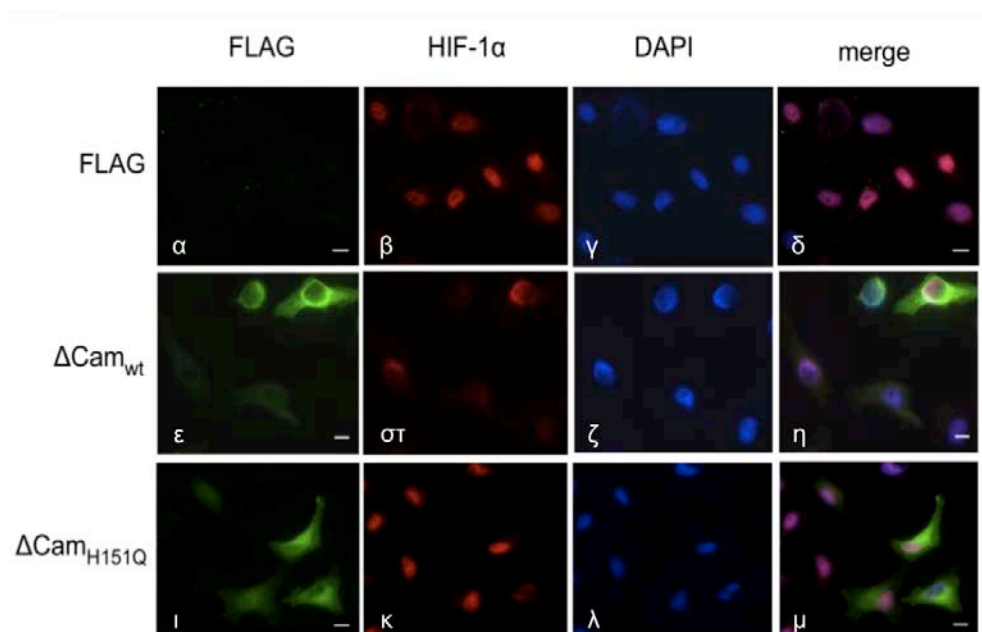
100%). Οι τιμές του διαγράμματος παρουσιάζουν το μέσο όρο τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων και σύνολο 12 τιμών (-/+ s.e.m., **: $P < 0.01$, n.s.: μη σημαντική διαφορά).

Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η καταλυτική δράση της φωσφατάσης ευθύνεται για την αναστολή της δράσης των HIF. Επίσης, η παρατηρούμενη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF μετά από υπερέκφραση της συνεχώς ενεργοποιημένης μορφής της PPP3CA, δε φάνηκε να οφείλεται σε αποσταθεροποίηση των HIF-α υπομονάδων. Η επίδραση με τη μορφή αυτή (Δ Cam wt) δεν επηρέασε τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες υποξίας, σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (Εικόνα 49, ανοσοαποτύπωση), όπως προέκυψε με ποσοτικοποίηση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Εικόνα 49, αντίστοιχα διαγράμματα). Το ίδιο παρατηρήθηκε και για την επίδραση με την καταλυτικά ανενεργή μορφή της PPP3CA (Δ Cam HQ).



Εικόνα 49: Η υπερέκφραση των μεταλλαγμένων μορφών της PPP3CA δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών HIF-1α και HIF-2α στην υποξία. (Α) Ανάλυση κατά Western με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων για τις υπό μελέτη πρωτεΐνες, σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της PPP3CA και επώαστηκαν για 8 ώρες σε υποξία (1% O_2). Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των HIF-1α και HIF-2α από τρία ανεξάρτητα πειράματα ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας τα επίπεδα της ιστόνης 3 για την κανονικοποίηση (-/+ s.e.m., n.s.: μη σημαντική διαφορά).

Επιπλέον, η επίδραση με τη συνεχώς ενεργοποιημένη μορφή της PPP3CA δεν φάνηκε να μεταβάλλει τον πυρηνικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 50, εικόνα στ σε σχέση με εικόνα β). Στις εικόνες της μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού, παρατηρήθηκε επίσης και η υποκυτταρική κατανομή των μεταλλαγμένων μορφών της PPP3CA, με τη χρήση αντισώματος ενάντια στον επίτοπο FLAG (Εικόνα 50, εικόνες ε και ι). Οι διάφορες μορφές της φωσφατάσης, εμφανίστηκαν να έχουν κυτταροπλασματικό εντοπισμό, σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία, ο οποίος δε μεταβλήθηκε μεταξύ νορμοξίας και υποξίας.



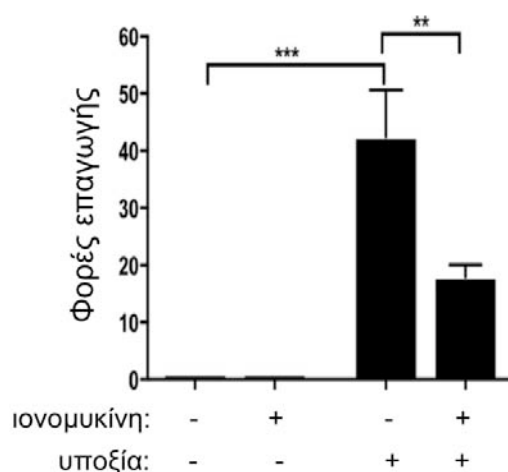
Εικόνα 50: Ο πυρηνικός εντοπισμός του ενδογενούς HIF-1α δεν επηρεάζεται από την υπερέκφραση των μεταλλαγμένων μορφών της PPP3CA. Εικόνες μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό των μεταλλαγμένων μορφών της PPP3CA και του ενδογενούς HIF-1α με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Κύτταρα HeLa που εκφράζουν τη συνεχώς ενεργή ή συνεχώς ανενεργή μορφή της φωσφατάσης, επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και υποξίας (1% O₂) για 8 ώρες και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού με φακό 40x. Με DAPI επισημαίνονται οι πυρήνες. Η κλίμακα ορίστηκε στα 10 μM.

Γ.1.2.3 Μελέτη της επίδρασης της ιονομυκίνης στη ρύθμιση των HIF

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της πλήρους ενεργοποίησης της ενδογενούς PPP3CA, στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF σε συνθήκες υποξίας. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (παράγραφος Α.6.1), η δράση της καλσινευρίνης εξαρτάται από τα επίπεδα του Ca²⁺ μέσα στο κύτταρο. Το Ca²⁺ δεσμεύεται από την καλμοδουλίνη και στη συνέχεια το σύμπλοκο CaM-Ca²⁺ συνδέεται στην PPP3CA. Η δέσμευση αυτή προωθεί την αλλαγή της τρισδιάστατης διαμόρφωσης της PPP3CA και την απελευθέρωση της επικράτειας

αυτοκαταστολής από το ενεργό της κέντρο, με αποτέλεσμα η φωσφατάση να καθίσταται ενεργή. Συνεπώς, η αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} στα κύτταρα, οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας της PPP3CA, λόγω της αύξησης των μορίων που είναι ικανά να προκαλέσουν κατάλυση. Για το σκοπό αυτό, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ιονοφόρο ιονομυκίνη, το οποίο προκαλεί την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του Ca^{2+} , σαν ενεργοποιητής της ενδογενούς μορφής της PPP3CA.

Έτσι, σε κύτταρα HeLa, τα οποία είχαν προηγουμένως διαμολυνθεί με τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης, έγινε προεπώαση των κυττάρων με ιονομυκίνη για 1 ώρα πριν τα κύτταρα υποβληθούν σε υποξία. Όπως φάνηκε, η εξαρτώμενη από την υποξία μεταγραφική ενεργότητα μειώθηκε σημαντικά, κατά περίπου 50%, μετά από επίδραση με ιονομυκίνη σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς της υποξίας (Εικόνα 51, στήλη 4 σε σχέση με στήλη 3), γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης της συνεχώς ενεργοποιημένης μορφής της PPP3CA.

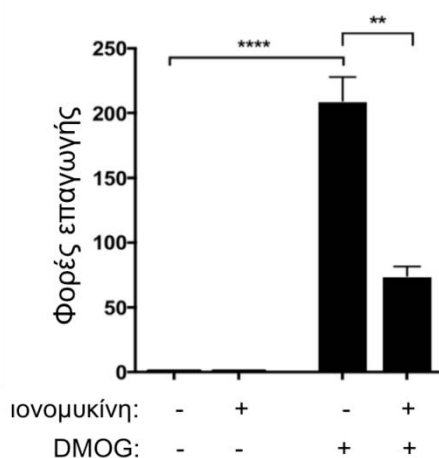


Εικόνα 51: Η ενεργοποίηση της ενδογενούς PPP3CA με ιονομυκίνη μειώνει σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF στην υποξία. Μέτρηση της δράσης λουσιφεράσης, εκφρασμένη ως φορές επαγωγής σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη νορμοξίας, σε κύτταρα HeLa που έχουν διαμολυνθεί με τα πλασμίδια pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pCL-Renilla. 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία ή απουσία 1 μM ιονομυκίνης για 1 ώρα και στη συνέχεια για 8 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O_2) ή υποξίας (1% O_2). Οι τιμές του διαγράμματος αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και σύνολο 9 τιμών ($-/+$ s.e.m., **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η ιονομυκίνη επιδρά στους HIF ή είναι αποτέλεσμα της έκθεσης των κυττάρων στην υποξία γενικότερα, χρησιμοποιήθηκε η ουσία DMOG, η οποία, είναι αναστολέας των προλυλ-υδροξυλασών (PHD) και προκαλεί την σταθεροποίηση των HIF σε συνθήκες νορμοξίας. Έτσι, σε κύτταρα HeLa τα οποία είχαν προηγουμένως

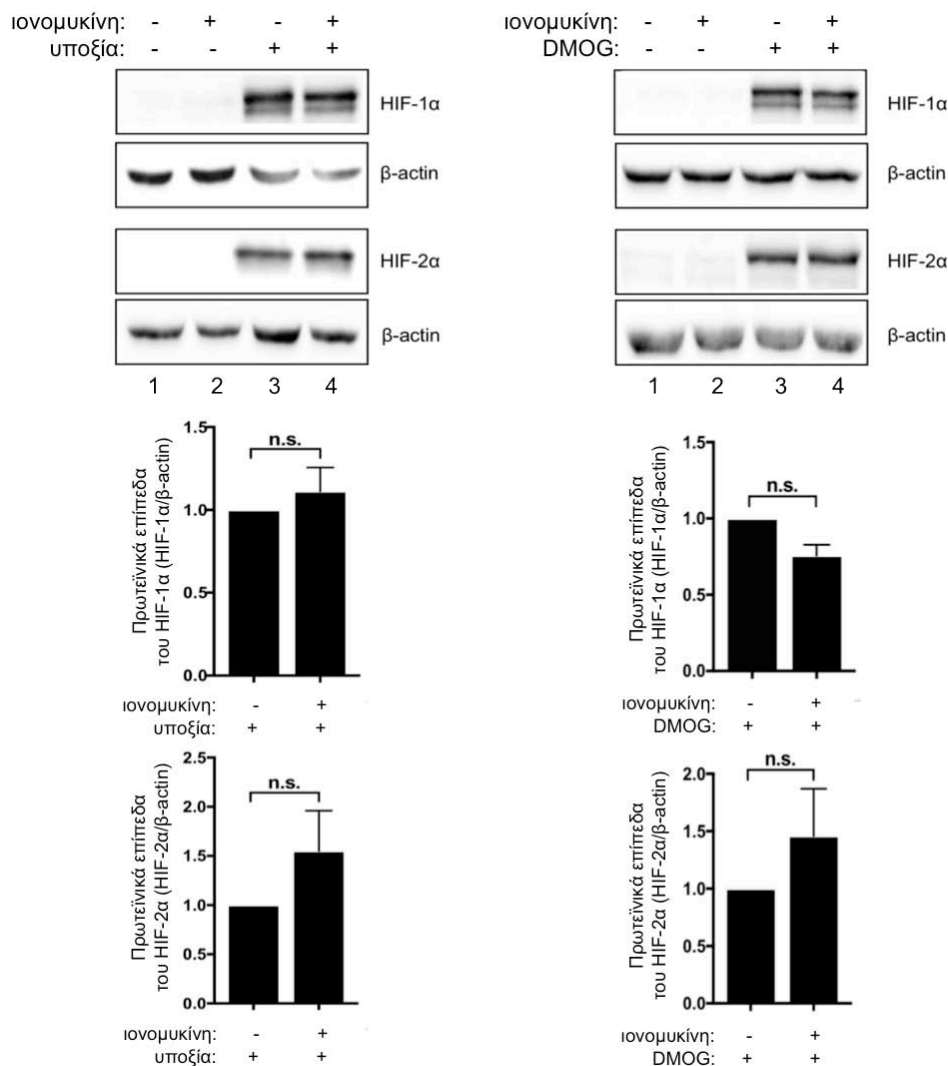
διαμολυνθεί με τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης, έγινε επίδραση με ιονομυκίνη και DMOG σε συνθήκες νορμοξίας.

Ενώ όπως ήταν αναμενόμενο η επώαση μόνο με το DMOG προκάλεσε την αύξηση της ενεργότητας των HIF (Εικόνα 52, στήλη 3), όταν παράλληλα με το DMOG έγινε επίδραση με ιονομυκίνη, παρατηρήθηκε η δραματική μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF που προκαλείται από το DMOG (Εικόνα 52, στήλη 4 σε σχέση με στήλη 3). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας από την ιονομυκίνη, οφείλεται αποκλειστικά στην επίδραση της τελευταίας στη δράση των HIF κι όχι σε άλλους παράγοντες της υποξίας.



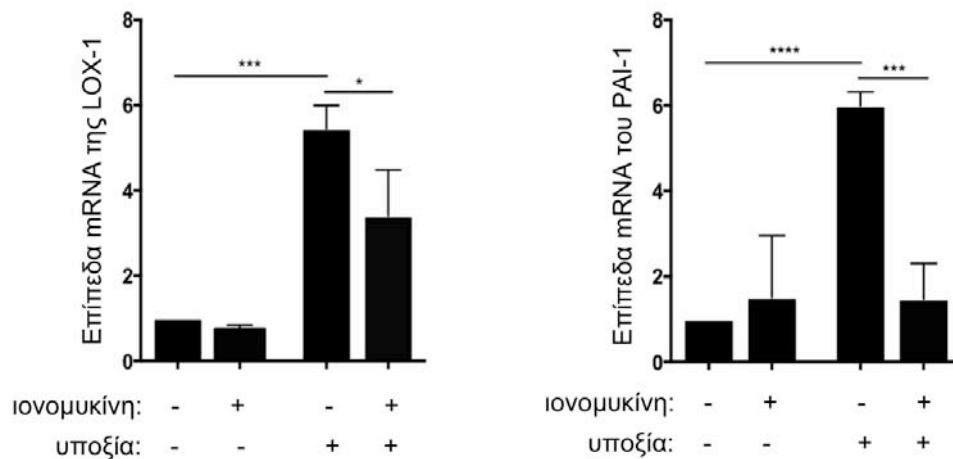
Εικόνα 52: Η ιονομυκίνη αναστέλλει τη δράση των HIF μετά από σταθεροποίηση τους με DMOG στη νορμοξία. Μέτρηση της δράσης λουσιφεράσης, εκφρασμένη ως φορές επαγωγής σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη νορμοξίας, σε κύτταρα HeLa που έχουν διαμολυνθεί με τα πλασμίδια pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pCL-Renilla. 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ή απουσία 1 μ M ιονομυκίνης για 1 ώρα και στη συνέχεια παρουσία ή απουσία 1 mM DMOG για επιπλέον 8 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O_2). Οι τιμές του διαγράμματος αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων και σύνολο 9 τιμών (-/+ s.e.m., **: $P < 0.01$, ****: $P < 0.0001$).

Παρά τη σημαντική μείωση της ενεργότητας των HIF, σε καμία από τις δύο περιπτώσεις (υποξία ή επίδραση με DMOG), η ιονομυκίνη δεν επηρέασε τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών HIF-1 α και HIF-2 α σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς (Εικόνα 53, ανοσοαποτύπωση διαδρομή 4 σε σχέση με διαδρομή 3), όπως παρουσιάζεται και στα διαγράμματα που απεικονίζουν την ποσοτικοποίηση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Εικόνα 53, αντίστοιχα διαγράμματα). Επιπλέον, η ιονομυκίνη από μόνη της δεν προκάλεσε τη σταθεροποίηση τους σε συνθήκες νορμοξίας (Εικόνα 53, ανοσοαποτύπωση διαδρομή 2 σε σχέση με διαδρομή 1).



Εικόνα 53: Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών HIF-1α και HIF-2α δεν επηρεάζονται από την ιονομυκίνη. (Α) Ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στις υπό μελέτη πρωτεΐνες, σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που έχουν κατεργαστεί παρουσία ή απουσία 1 μM ιονομυκίνης. Τα κύτταρα στη συνέχεια επώαστηκαν στην υποξία (1% O₂) ή παρουσία 1 mM DMOG για 8 ώρες, επιπλέον. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των HIF-1α ή HIF-2α σε σχέση με την β-actin, που προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα ανοσοαποτύπωσης (-/+ s.e.m., n.s.: μη σημαντική διαφορά).

Προκειμένου να μελετηθεί ποια από τις δύο ισομορφές HIF επηρεάζεται σε επίπεδο μεταγραφής γονιδίων-στόχων από την ενεργοποίηση της PPP3CA με ιονομυκίνη, μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA ειδικών γονιδίων-στόχων της υποξίας με ποσοτική RT-PCR. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η μεταγραφή των γονιδίων *LOX-1*, ειδικού γονιδίου-στόχου του HIF-1 και *PAI-1*, που ελέγχεται αποκλειστικά από τον HIF-2 (208), (10). Η αύξηση των επιπέδων των mRNA των δύο γονιδίων που παρατηρείται στην υποξία μειώνεται στατιστικά σημαντικά μετά από επίδραση με ιονομυκίνη, μόνο σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 54, στήλη 4 σε σχέση με στήλη 3).

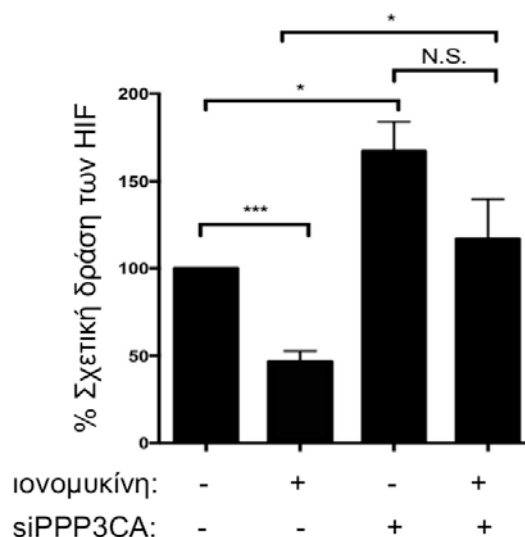


Εικόνα 54: Η ιονομυκίνη προκαλεί την αναστολή της μεταγραφής ειδικών γονιδίων-στόχων των HIF-1 και HIF-2 στην υποξία. Μέτρηση των επιπέδων mRNA ειδικών γονιδίων-στόχων των HIF-1α (*LOX-1*) και HIF-2α (*PAI-1*) με qRT-PCR, σε κύτταρα HeLa, τα οποία έχουν κατεργαστεί παρουσία ή απουσία 1 μ M ιονομυκίνης για 1 ώρα και επώαστηκαν για επιπλέον 8 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O_2) ή υποξίας (1% O_2). Σαν εσωτερικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *18S* για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (-/+ s.d., *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$).

Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η χημική επαγωγή της δράσης της PPP3CA από την ιονομυκίνη, ρυθμίζει αρνητικά τη δράση τόσο του HIF-1 όσο και του HIF-2 και αναστέλλει την εξαρτώμενη από την υποξία μεταγραφή γονιδίων.

Γ.1.2.4 Η ιονομυκίνη αναστέλλει τη δράση των HIF μέσω της PPP3CA

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η επίδραση της ιονομυκίνης στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF οφείλεται στην ενεργοποίηση της PPP3CA κι όχι κάποιου άλλου μονοπατιού, μελετήθηκε η δράση της σε κύτταρα στα οποία αποσιωπήθηκε η PPP3CA καθώς και σε κοντρόλ κύτταρα. Έτσι, σε κύτταρα HeLa τα οποία είχαν διαμολυνθεί ταυτόχρονα με το siRNA της PPP3CA ή με κοντρόλ siRNA και με τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης, έγινε επίδραση με ιονομυκίνη και κατόπιν επώαση σε συνθήκες υποξίας.



Εικόνα 55: Η επίδραση της ιονομυκίνης στη ρύθμιση των HIF διαμεσολαβείται από την PPP3CA.

Μέτρηση της δράσης της λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa που συνδιαμολύνθηκαν με το siRNA της PPP3CA ή το κοντρολ siRNA και με τα πλασμίδια pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pCL-Renilla. 40 ώρες μετά τη διαμόλυνση έγινε επίδραση παρουσία ή απουσία 1 μ M ιονομυκίνης για 1 ώρα και στη συνέχεια τα κύτταρα επώστηκαν για επιπλέον 8 ώρες σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂). Η δράση λουσιφεράσης στην υποξία έχει κανονικοποιηθεί με την αντίστοιχη συνθήκη στη νορμοξία και έχει εκφραστεί ως % σχετική δράση σε σχέση με την κοντρόλ συνθήκη της υποξίας (κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το κοντρολ siRNA και δεν έχουν κατεργαστεί με ιονομυκίνη = 100%). Οι τιμές του διαγράμματος αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (-/+ s.e.m., *: P<0.05, ***: P<0.001, n.s.: μη σημαντική διαφορά).

Παρατηρήθηκε, ότι η ιονομυκίνη από μόνη της μειώνει στατιστικά σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF κατά περίπου 50% (Εικόνα 55, σύγκριση στήλης 2 με στήλη 1), όπως δείχθηκε και στην παράγραφο Γ.1.2.3. Όταν όμως η έκφραση της PPP3CA αποσιωπάται μέσα στα κύτταρα, η επίδραση της ιονομυκίνης δε γίνεται εμφανής, και η δράση των HIF δεν επηρεάζεται σημαντικά σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς, αλλά και όταν μόνο η PPP3CA έχει αποσιωπηθεί (Εικόνα 55, σύγκριση στήλης 2 με στήλη 4).

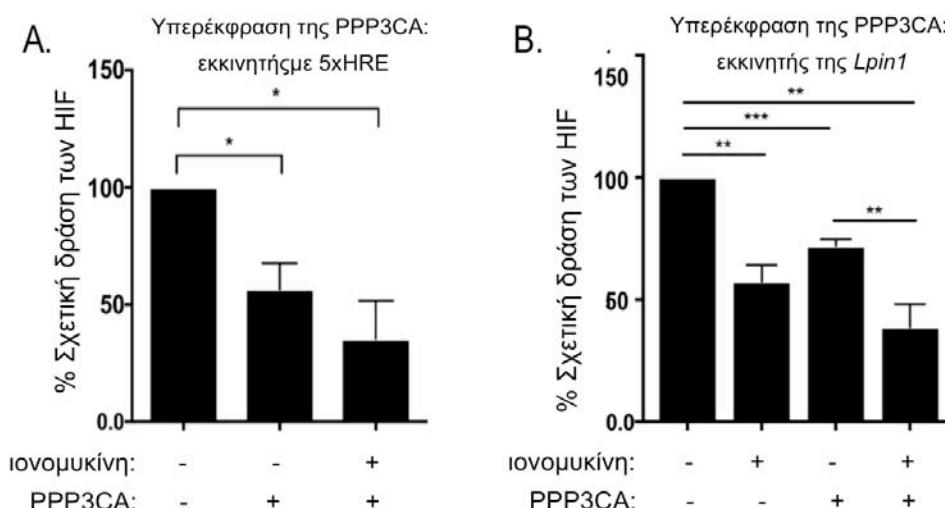
Με βάση τα παραπάνω επιβεβαιώνεται ότι η επίδραση της ιονομυκίνης στους HIF διαμεσολαβείται από την PPP3CA.

Γ.1.2.5 Επίδραση κυττάρων HeLa με ιονομυκίνη μετά από υπερέκφραση της PPP3CA

Προκειμένου να μελετηθεί σε συνδυασμό η επίδραση της PPP3CA και της ιονομυκίνης στη ρύθμιση του HIF-1, σε κύτταρα HeLa υπερεκφράστηκε η πλήρους μεγέθους PPP3CA σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG (FLAG-PPP3CA f.l.) και στη συνέχεια έγινε επίδραση με ιονομυκίνη και υποξία. Παράλληλα με την PPP3CA, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που εκφράζουν τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας, είτε υπό τον έλεγχο των 5

HRE που ανήκουν στον υποκινητή του γονιδίου *VEGF* (Εικόνα 56Α), ή υπό τον έλεγχο ολόκληρου του υποκινητή του γονιδίου της *LPIN1* (Εικόνα 56Β), και τη Renilla λουσιφεράση. Στην πρώτη περίπτωση δηλαδή, εξετάστηκε η μεταγραφική ενεργότητα που οφείλεται και στις δύο ισομορφές HIF, αφού ο *VEGF* αποτελεί κοινό γονίδιο-στόχο, ενώ στη δεύτερη περίπτωση μετρήθηκε η μεταγραφική ενεργότητα αποκλειστικά του HIF-1, καθώς η *LPIN1* αποτελεί ειδικό γονίδιο-στόχο του HIF-1 (236).

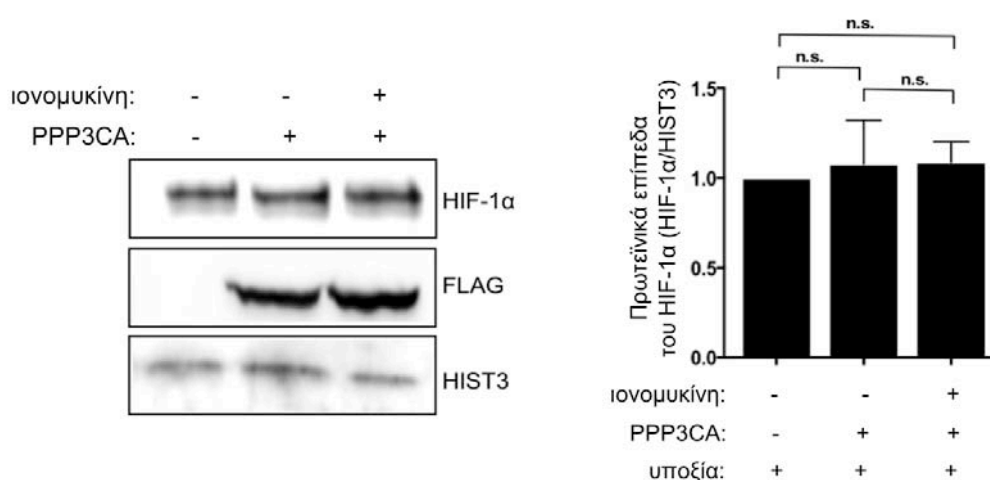
Όπως ήταν αναμενόμενο με βάση τα προηγούμενα πειράματα, τόσο η υπερέκφραση της PPP3CA, όσο και η επίδραση με ιονομυκίνη από μόνα τους ανέστειλαν σημαντικά την εξαρτώμενη από τα HRE μεταγραφική ενεργότητα (Εικόνα 56Α), καθώς και την ενεργοποίηση του υποκινητή της *LPIN1* (Εικόνα 56Β, στήλες 2 και 3 σε σχέση με τη στήλη 1), σε συνθήκες υποξίας. Η μείωση αυτή έγινε, όμως, ακόμη μεγαλύτερη μετά από το συνδυασμό των δύο παραπάνω συνθηκών (Εικόνα 56Α, στήλη 3 και Εικόνα 54Β, στήλη 4).



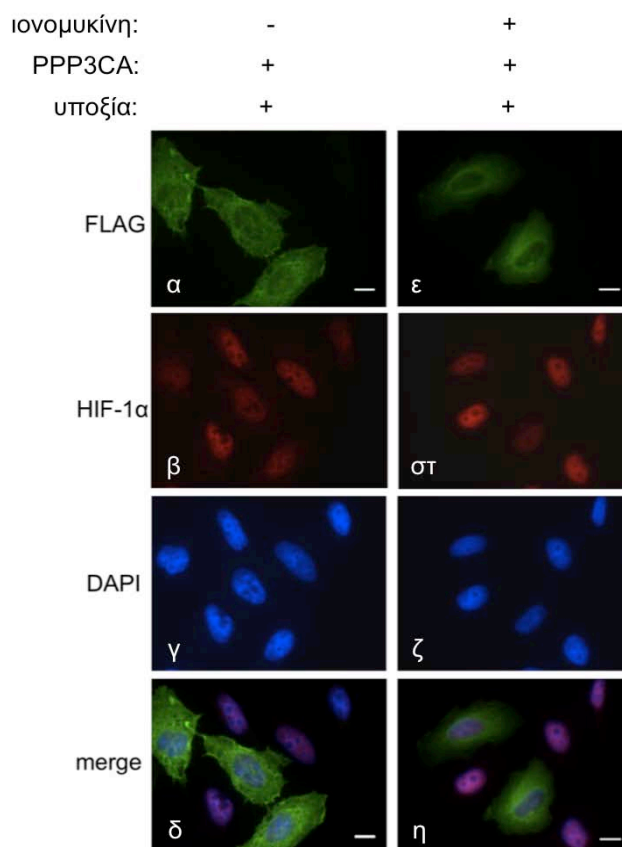
Εικόνα 56: Η συνδυασμένη επίδραση της υπερέκφρασης της PPP3CA και της ιονομυκίνης στην εξαρτώμενη από τα HRE και την εξαρτώμενη από τον HIF-1 μεταγραφική ενεργότητα στην υποξία. Μέτρηση της δράσης της λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa που έχουν διαμολυνθεί με τον άδειο φορέα pCMV2-FLAG ή το πλασμίδιο που κωδικοποιεί για την FLAG-PPP3CA f.l., έχουν κατεργαστεί παρουσία ή απουσία 1 μ M ιονομυκίνης για 1 ώρα και στη συνέχεια επώαστηκαν για επιπλέον 8 ώρες σε νορμοξία (21% O_2) ή υποξία (1% O_2). (Α) Ταυτόχρονη διαμόλυνση με τα πλασμίδια pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pCL-Renilla. (Β) Ταυτόχρονη διαμόλυνση με τα πλασμίδια pGL3-Lpin1-Luc και pCL-Renilla. Η δράση λουσιφεράσης στην υποξία έχει κανονικοποιηθεί με την αντίστοιχη συνθήκη στη νορμοξία και έχει εκφραστεί ως % σχετική δράση σε σχέση με την κοντρόλ συνθήκη της υποξίας (κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τον άδειο φορέα pCMV2-FLAG και δεν έχουν κατεργαστεί με ιονομυκίνη = 100%). Οι τιμές του διαγράμματος αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (-/+ s.e.m., *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, έγινε εμφανές ότι η υπερέκφραση της PPP3CA και η ιονομυκίνη έχουν αθροιστική δράση στη ρύθμιση των HIF. Μάλιστα, η διαφορά του συνδυασμού επίδρασης με PPP3CA και ιονομυκίνη σε σχέση με την συνθήκη υπερέκφρασης της PPP3CA, βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική στην περίπτωση ρύθμισης αποκλειστικά του HIF-1 και την ενεργοποίηση του υποκινητή της λιπίνης 1 (Εικόνα 56B, σύγκριση στήλης 4 με στήλη 3).

Η συνδυασμένη επίδραση με PPP3CA και ιονομυκίνη, σύμφωνα και με τα προηγούμενα αποτελέσματα, δε φάνηκε να επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ενδογενούς HIF-1α (Εικόνα 57), ούτε να μεταβάλλει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του (Εικόνα 58, εικόνα στ σε σχέση με εικόνα β), σε συνθήκες υποξίας.



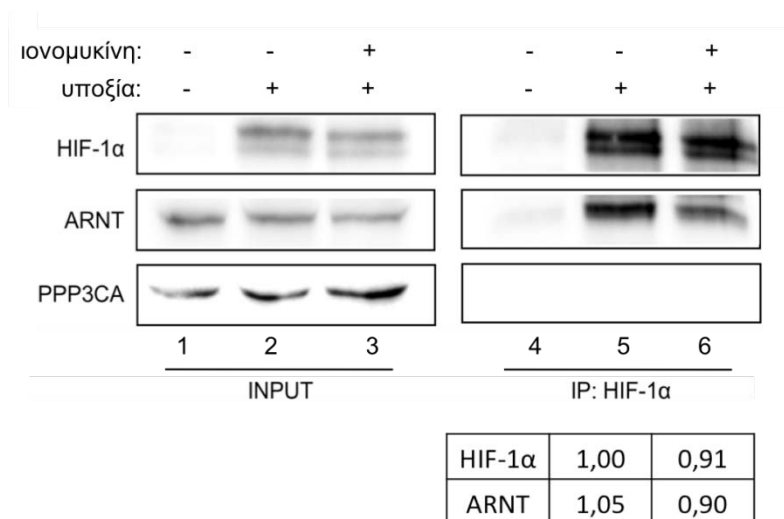
Εικόνα 57: Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ενδογενούς HIF-1α δεν επηρεάζονται από το συνδυασμό της υπερέκφρασης της αγρίου τύπου PPP3CA και της επίδρασης με ιονομυκίνη. (Α) Ανάλυση κατά Western με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στις υπό μελέτη πρωτεΐνες, σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που έχουν διαμολυνθεί με τον άδειο φορέα pCMV2-FLAG ή το πλασμίδιο που κωδικοποιεί για την FLAG-PPP3CA f.l., έχουν κατεργαστεί παρουσία ή απουσία 1 μ M ιονομυκίνης για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάστηκαν για επιπλέον 8 ώρες σε υποξία (1% O_2). Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α σε σχέση με τα επίπεδα της ιστόνης 3, από τρία ανεξάρτητα πειράματα ανοσοαποτύπωσης (-/+ s.e.m., n.s.: μη σημαντική διαφορά).



Εικόνα 58: Η συνδυασμένη επίδραση με υπερέκφραση της PPP3CA και με ιονομυκίνη δεν επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α στην υποξία. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού σε κύτταρα HeLa που κατεργάστηκαν όπως στην εικόνα 55, με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στον HIF-1α (κόκκινο κανάλι) και τον επίτοπο FLAG για την παρατήρηση της PPP3CA f.l. (πράσινο κανάλι). Το DAPI χρησιμοποιήθηκε για την χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Η κλίμακα ορίστηκε στα 10 μM.

Γ.1.2.6 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της PPP3CA με τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας

Με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα, έχειδειχθεί ότι η PPP3CA ρυθμίζει αρνητικά τη δράση του HIF-1, χωρίς να είναι γνωστό αν αυτό πραγματοποιείται άμεσα ή έμμεσα. Για να διαπιστωθεί εάν ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την PPP3CA, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Από εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που επωάστηκαν σε υποξία για 8 ώρες, παρουσία ή απουσία ιονομυκίνης, έγινε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα ενάντια στον HIF-1α. Στη συνέχεια, με ανοσοαποτύπωση κατά Western ελέγχθηκε αν η PPP3CA ανοσοκατακρημνίζεται μαζί με τον HIF-1α (Εικόνα 59).



Εικόνα 59: Η PPP3CA δεν αλληλεπιδρά με τον HIF-1α σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Τα διαλυτά κλάσματα (inputs) και οι πρωτεΐνες που ανοσοκατακρήμνίστηκαν μαζί με τον HIF-1α (IP) από κύτταρα HeLa που έχουν επωαστεί παρουσία ή απουσία 1 μM ιονομυκίνης για 1 ώρα και στη συνέχεια για επιπλέον 8 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂), αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντισώματα. Στον πίνακα φαίνεται η ποσοτικοποίηση των επιπέδων των HIF-1α και ARNT που ανοσοκατακρήμνίστηκαν (δύο ανεξάρτητα πειράματα).

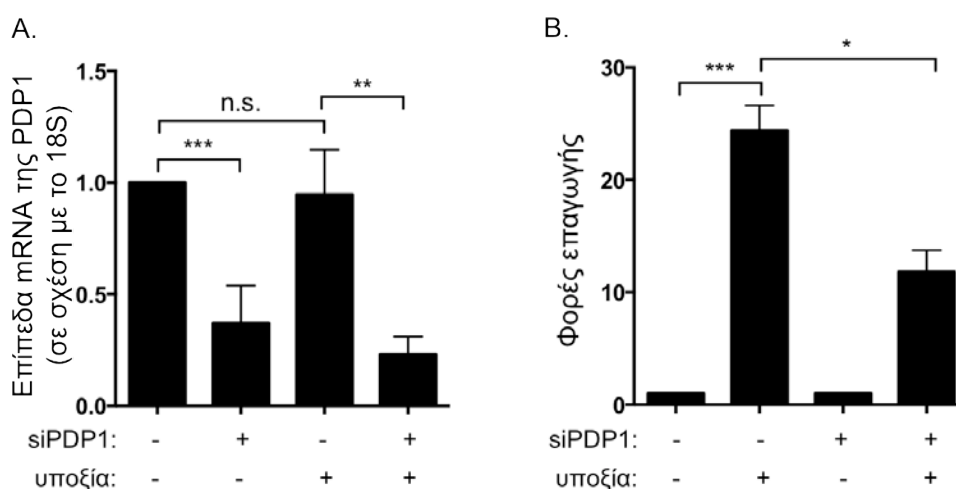
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ενδογενής PPP3CA που υπάρχει στα κυτταρικά εκχυλίσματα (διαδρομές 1-3), δεν ανοσοκατακρήμνίστηκε μαζί με τον HIF-1α στην υποξία, ούτε παρουσία (διαδρομή 6) ούτε απουσία (διαδρομή 5) ιονομυκίνης (Εικόνα 59). Αυτό έδωσε μια πρώτη ένδειξη ότι η PPP3CA δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τον HIF-1α. Παρόλα αυτά δε μπορεί να αποκλειστεί μια πιθανή αλληλεπίδραση. Τόσο η φωσφορυλίωση όσο και η αποφωσφορυλίωση είναι πολύ γρήγορες αντιδράσεις, και η δημιουργία σταθερού συμπλόκου μεταξύ ενζύμου (κινάσης ή φωσφατάσης) και υποστρώματος (HIF-1α στην περίπτωση αυτή) είναι εξαιρετικά σύντομη και ίσως μια τέτοια αλληλεπίδραση να μην είναι εύκολα ανιχνεύσιμη.

Επιπλέον, από τα προηγούμενα αποτελέσματα φάνηκε ότι ο μηχανισμός μέσω του οποίου η PPP3CA αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, δεν περιλαμβάνει την αποσταθεροποίηση του HIF-1α, ούτε την εξαγωγή του στο κυτταρόπλασμα. Καθώς ο ετεροδιμερισμός του HIF-1α με τον ARNT είναι συνήθης τρόπος ρύθμισης της ενεργότητας του HIF-1, ελέγχθηκε αν η PPP3CA επηρεάζει το σχηματισμό του ενεργού συμπλόκου. Σύμφωνα με τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, η επίδραση με ιονομυκίνη, δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στη δέσμευση του HIF-1α με τον ARNT (Εικόνα 59, διαδρομή 6 σε σχέση με διαδρομή 5 και πίνακας ποσοτικοποίησης) και άρα η PPP3CA δεν επηρεάζει τον σχηματισμό διμερούς HIF-1.

Γ.1.3 Ο ρόλος της φωσφατάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDP1) στη ρύθμιση των HIF

Γ.1.3.1 Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης της PDP1 στη ρύθμιση της δράσης των HIF σε συνθήκες υποξίας

Από τη δοκιμασία διαλογής (παράγραφος Γ.1.1), βρέθηκε ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της φωσφατάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDP1) μείωσε σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF στην υποξία, και μάλιστα αποτέλεσε την φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης που προκάλεσε την ισχυρότερη αρνητική επίδραση. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η αποσιώπηση της PDP1 αναστέλλει τη δράση των HIF, χρησιμοποιήθηκε ένα διαφορετικό, από αυτά της βιβλιοθήκης, siRNA για τη φωσφατάση (Hs-PPM2C-5). Αρχικά έγινε έλεγχος της ικανότητας αποσιώπησης της PDP1 από το ειδικό αυτό siRNA μετρώντας τα επίπεδα mRNA της PDP1. Πράγματι, με επίδραση του Hs-PPM2C-5 siRNA σε κύτταρα HeLa προκλήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA της φωσφατάσης PDP1, έως και 80%, τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου όσο και στην υποξία (Εικόνα 60A, στήλη 2 σε σχέση με στήλη 1 και στήλη 4 σε σχέση με στήλη 3), δείχνοντας την ειδικότητα του συγκεκριμένου siRNA. Η ανάλυση της μεταγραφής της PDP1 έδειξε επίσης πως τα επίπεδα mRNA της δε μεταβλήθηκαν μεταξύ νορμοξίας και υποξίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υποξία δεν επάγει την έκφραση της φωσφατάσης (Εικόνα 60A, στήλη 3 σε σχέση με στήλη 1).



Εικόνα 60: Η αποσιώπηση της PDP1 μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF σε συνθήκες υποξίας.

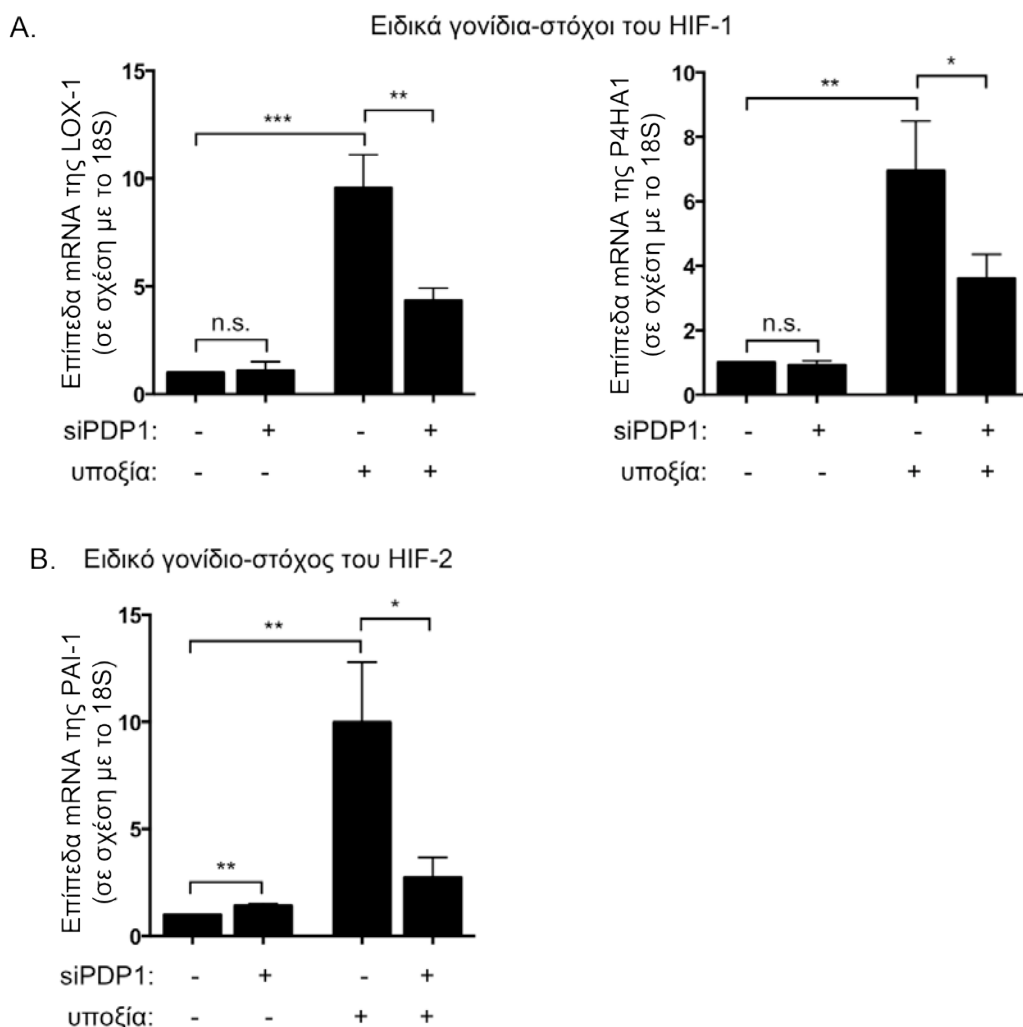
(Α) Μέτρηση των επιπέδων mRNA της φωσφατάσης PDP1 με q-RT-PCR, σε κύτταρα HeLa τα οποία διαμολύνθηκαν με το siRNA της PDP1 (Hs-PPM2C-5) ή το κοντρόλ siRNA για 40 ώρες και ακολούθως επώαστηκαν για 8 ώρες σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂). Τα επίπεδα mRNA του 18S

χρησιμοποιήθηκαν για την εξομάλυνση των αποτελεσμάτων (-/+ s.d., **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$). (B) Μέτρηση της δράσης λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa που διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με το siRNA της PDP1 ή το κοντρόλ siRNA και τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pCL-Renilla για 40 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν για 8 ώρες σε 21% O₂ ή 1% O₂. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν φορές επαγωγής στην υποξία, συγκρινόμενα με τις αντίστοιχες τιμές της νορμοξίας. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και σύνολο 9 τιμών (-/+ s.e.m., *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της αποσιώπησης της PDP1 στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF. Για το σκοπό αυτό, έγινε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με το siRNA της PDP1 (Hs-PPM2C-5) ή με το κοντρόλ siRNA και τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης, σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Βρέθηκε ότι η αποσιώπηση της φωσφατάσης μείωσε σχεδόν στο μισό την εξαρτώμενη από τα HRE μεταγραφική ενεργότητα, μόνο σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 60B, στήλη 4 σε σχέση με στήλη 2), συμφωνώντας με τα αρχικά πειράματα αποσιώπησης (παράγραφος Γ.1.1).

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε αν η αποσιώπηση της PDP1 επηρεάζει την έκφραση ειδικών γονιδίων-στόχων των HIF-1 και HIF-2 (10, 208, 243). Παρουσία του siRNA της PDP1 τόσο τα επίπεδα mRNA των γονιδίων που ελέγχονται αποκλειστικά από τον HIF-1 (*LOX-1* και *P4HA1*, Εικόνα 61A) όσο και αυτών που ελέγχονται από τον HIF-2 (*PAI-1*, Εικόνα 61B) μειώθηκαν σημαντικά στην υποξία, σε σχέση με το κοντρόλ (στήλες 4 σε σχέση με στήλες 3).

Τα παραπάνω δεδομένα που δείχνουν ότι όταν η PDP1 εκλείπει από τα καρκινικά κύτταρα οι HIF-1 και HIF-2 αναστέλλονται, υποδεικνύουν ότι η φωσφατάση PDP1 είναι θετικός ρυθμιστής της ενεργότητας των HIF.



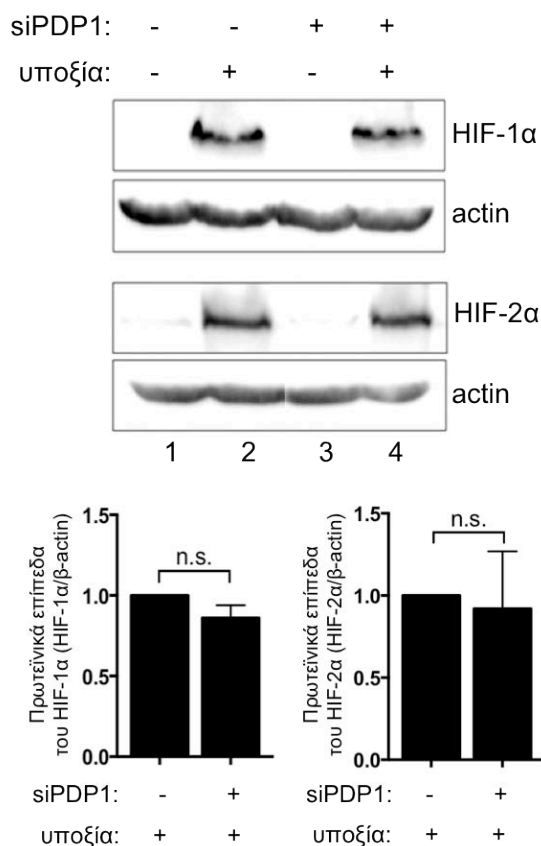
Εικόνα 61: Η αποσιώπηση της PDP1 προκαλεί την αναστολή της μεταγραφής ειδικών γονιδίων-στόχων των HIF-1 και HIF-2 στην υποξία. Μέτρηση των επιπέδων mRNA ειδικών γονιδίων στόχων των HIF-1 (*LOX-1*, *P4HA1*) και HIF-2 (*PAI-1*) με qRT-PCR, σε κύτταρα HeLa τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το siRNA της PDP1 ή το κοντρόλ siRNA και επωάστηκαν για 8 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂). Σαν εσωτερικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *18S* για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (-/+ s.d., *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

Γ.1.3.2 Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης της PDP1 στη σταθερότητα και τον εντοπισμό των HIF σε συνθήκες υποξίας

Προκειμένου να διασαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο η αποσιώπηση της PDP1 αναστέλλει τη δράση των HIF, ελέγχθηκε η επίδρασή της στην έκφραση και τον υποκυτταρικό εντοπισμό των τελευταίων.

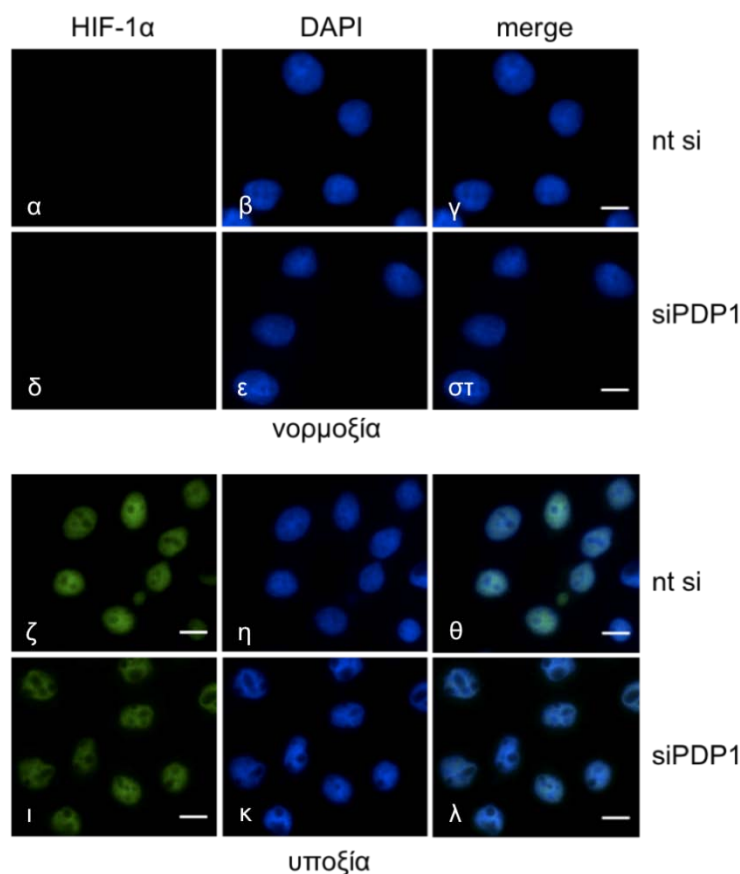
Σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που διαμολύνθηκαν με το siRNA της PDP1 ή το κοντρόλ siRNA, φάνηκε ότι η αποσιώπηση της φωσφατάσης δεν επηρέασε τα πρωτεϊνικά

επίπεδα των ενδογενών HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 62, διαδρομή 4 σε σχέση με διαδρομή 2 και αντίστοιχα διαγράμματα).



Εικόνα 62: Η αποσιώπηση της PDP1 δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών HIF-1α και HIF-2α στην υποξία. Ανάλυση ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa που διαμολύνθηκαν με το siRNA της PDP1 και επωάστηκαν για 8 ώρες σε νορμοξία (21% O₂) και υποξία (1% O₂). Ανοσοαποτύπωση των HIF-1α, HIF-2α και β-ακτίνης με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των HIF-1α και HIF-2α από τρία ανεξάρτητα πειράματα ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας τα επίπεδα της β-actin για την κανονικοποίησή τους (-/+ s.e.m., n.s.: μη σημαντική διαφορά).

Παράλληλα, σε κύτταρα HeLa που κατεργάστηκαν με τον ίδιο τρόπο, πειράματα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι ο πυρηνικός εντοπισμός του ενδογενούς HIF-1α δε μεταβλήθηκε παρουσία του siRNA της PDP1, σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου της υποξίας (Εικόνα 63, φωτογραφία ι σε σχέση με φωτογραφία ζ). Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου δεν παρατηρήθηκε σταθεροποίηση του HIF-1α μετά από την αποσιώπηση της PDP1 (Εικόνα 63, φωτογραφία δ σε σχέση με φωτογραφία α). Άρα, η ανασταλτική δράση της αποσιώπησης της PDP1 στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF, είναι ανεξάρτητη της σταθερότητας και του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-1α.

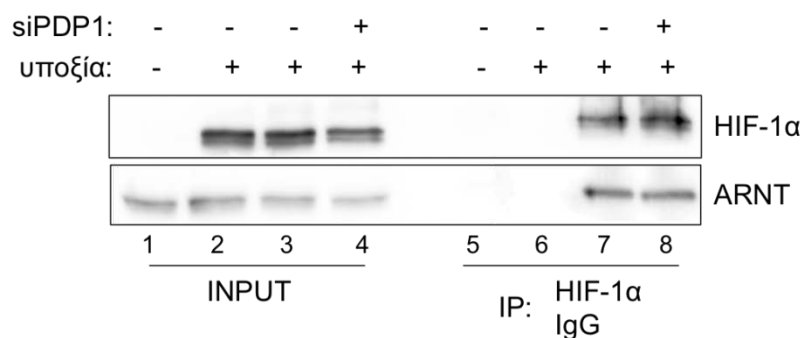


Εικόνα 63: Η αποσιώπηση της PDP1 δε μεταβάλλει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α στην υποξία. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού, σε κύτταρα HeLa τα οποία διαμολύνθηκαν με το siRNA της PDP1 ή με το κοντρόλ siRNA για 40 ώρες και επώαστηκαν για επιπλέον 8 ώρες σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂). Με πράσινο φθορισμό εμφανίζεται ο HIF-1α, ενώ η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI. Η κλίμακα ορίστηκε στα 10 μM.

Γ.1.3.3 Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης της PDP1 στον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT

Σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις, η αποσιώπηση της PDP1 δεν προκάλεσε την αποσταθεροποίηση του HIF-1α, ούτε την αλλαγή της υποκυτταρικής κατανομής του. Έτσι, εξετάστηκε αν η απουσία της φωσφατάσης επηρεάζει τη δημιουργία λειτουργικού συμπλόκου του HIF-1α με τον ARNT.

Για να διερευνηθεί η επίδραση της PDP1 στον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης του ενδογενούς HIF-1α, από εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που έχουν διαμολυνθεί με το siRNA της PDP1 ή το κοντρόλ siRNA.



Εικόνα 64: Η αποσιώπηση της PDP1 δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον ARNT. Ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα ενάντια στον HIF-1α (5^η, 7^η, 8^η διαδρομή) ή με IgG (6^η διαδρομή). Τα διαλυτά κλάσματα (inputs) και οι πρωτεΐνες που ανοσοκατακρημνίστηκαν μαζί με τον HIF-1α (IP), από κύτταρα HeLa που επώαστηκαν παρουσία ή απουσία του siRNA της PDP1 για 8 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂), αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντισώματα.

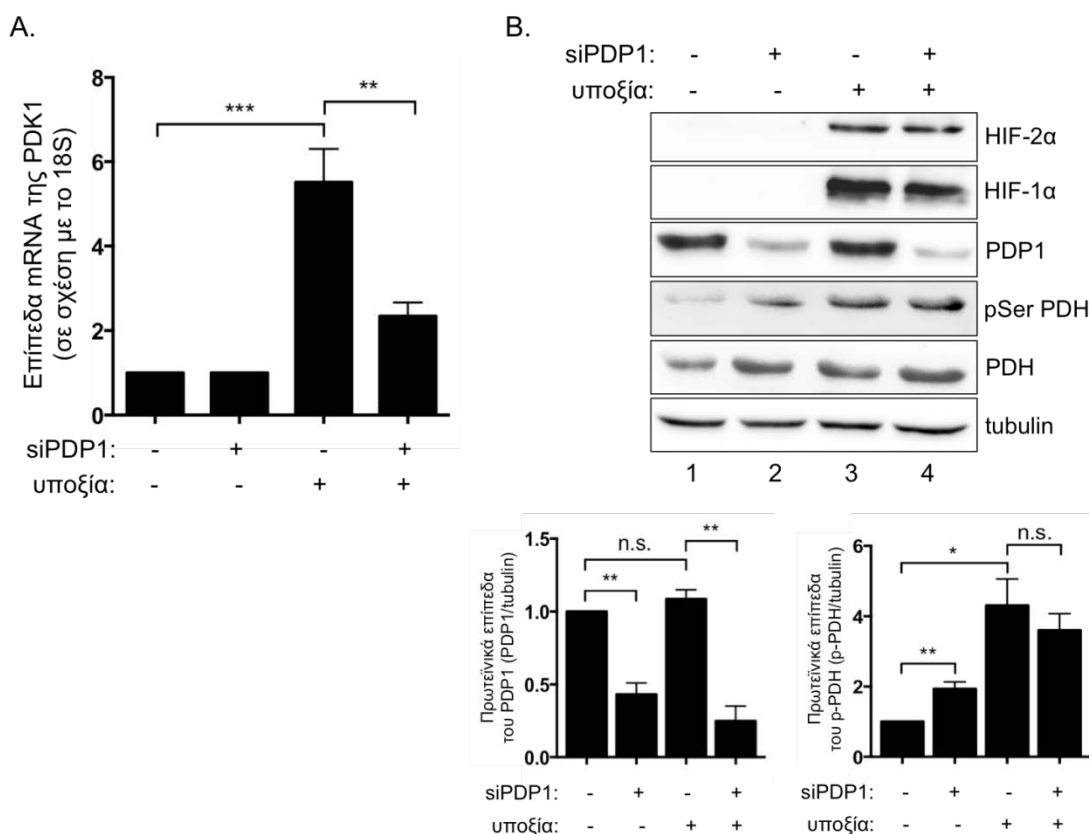
Παρατηρήθηκε ότι το ποσό του ARNT που ανοσοκατακρημνίστηκε με τον HIF-1α δε μεταβλήθηκε μετά από την αποσιώπηση της PDP1 σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 64, διαδρομές 7 και 8). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η απουσία της PDP1 δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον ARNT.

Γ.1.3.4 Διερεύνηση του ρόλου της αποσιώπησης της PDP1 στη λειτουργία του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, σε συνθήκες υποξίας

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (παράγραφος Α.6.2), ο μόνος γνωστός ρόλος της φωσφατάσης PDP1 είναι η ρύθμιση της λειτουργίας του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDC), που αποτελεί κομβικό σημείο του μεταβολισμού των κυττάρων. Ο HIF-1 ως κύριος ρυθμιστής του επαναπρογραμματισμού του μεταβολισμού σε συνθήκες υποξίας, επηρεάζει επίσης τη λειτουργία του PDC, επάγοντας τη μεταγραφή του γονιδίου της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, *PDK1*. Επομένως, η αναστολή της δράσης του HIF-1 από την αποσιώπηση της PDP1 αναμένεται να επηρεάζει τη λειτουργία του μεταβολισμού.

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση της αποσιώπησης της PDP1 στη λειτουργία του PDC, ελέγχοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDH) σε κύτταρα HeLa τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το siRNA της PDP1 ή το κοντρόλ siRNA. Στα ολικά εκχυλίσματα των κυττάρων παρατηρήθηκε αρχικά ότι στην υποξία αυξήθηκαν σημαντικά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης PDH, σε σχέση με τη νορμοξία (Εικόνα 65B, διαδρομή 3 σε σχέση με διαδρομή 2 και αντίστοιχο διάγραμμα στήλη 3 σε σχέση με στήλη 2), καθώς όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στην υποξία επάγεται η

έκφραση της PDK1, ειδικού γονιδίου-στόχου του HIF-1 (Εικόνα 65A). Η PDH φυσιολογικά φωσφορυλιώνεται από την PDK1 με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του PDC, προωθώντας την αναερόβια γλυκόλυση και την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Από την άλλη, η PDP1 αποφωσφορυλιώνει την PDH, ενεργοποιεί το σύμπλοκο και προωθεί την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Σύμφωνα με τα παραπάνω, αναμένεται η αποσιώπηση της PDP1 να οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της PDH.



Εικόνα 65: Η αποσιώπηση της PDP1 στην υποξία δεν επάγει περαιτέρω τη φωσφορυλίωση της PDH. (Α) Μέτρηση των επιπέδων mRNA της PDK1 με qRT-PCR, σε κύτταρα HeLa τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το siRNA της PDP1 ή το κοντρόλ siRNA και επωάστηκαν για 8 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂). Σαν εσωτερικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *18S* για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (-/+ s.d., **: P<0.01, ***: P<0.001). (Β) Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που κατεργάστηκαν όπως στο (Α). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-1α, HIF-2α, PDP1, PDH, pPDH, tubulin ανιχνεύθηκαν με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των PDP1 και pPDH από τρία ανεξάρτητα πειράματα ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας τα επίπεδα της tubulin για την κανονικοποίηση τους (-/+ s.e.m., *: P<0.05, **: P<0.01, n.s.: μη σημαντική διαφορά).

Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε πως ενώ η αποσιώπηση της PDP1 στη νορμοξία οδήγησε σε αυξημένη φωσφορυλίωση της PDH από την PDK1, όπως αναμενόταν, στην υποξία δεν

παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση των επιπέδων της pPDH σε σχέση με το κοντρόλ (Εικόνα 65B, διαδρομή 4 σε σχέση με διαδρομή 3 και αντίστοιχο διάγραμμα στήλη 4 σε σχέση με στήλη 3).

Παράλληλα, μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της *PDK1* σε κύτταρα HeLa που κατεργάστηκαν όπως προηγουμένως. Η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων mRNA της κινάσης PDK1 από την υποξία (Εικόνα 65A, στήλη 3 σε σχέση με στήλη 1), αναστάλθηκε σημαντικά μετά από αποσιώπηση της PDP1 (Εικόνα 65A, στήλη 4 σε σχέση με στήλη 3), γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την προηγούμενη παρατήρηση.

Συνοψίζοντας, η αποσιώπηση της PDP1 προκαλεί την αναστολή της δράσης του HIF-1 οδηγώντας σε μείωση της μεταγραφής του γονιδίου *PDK1* σε συνθήκες υποξίας. Έτσι, παρόλο που η φωσφατάση PDP1 απουσιάζει από τα κύτταρα σε υποξία, το σύμπλοκο PDC δεν ενεργοποιείται περαιτέρω.

Γ.1.3.5 Κλωνοποίηση του γονιδίου της PDP1 στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N3

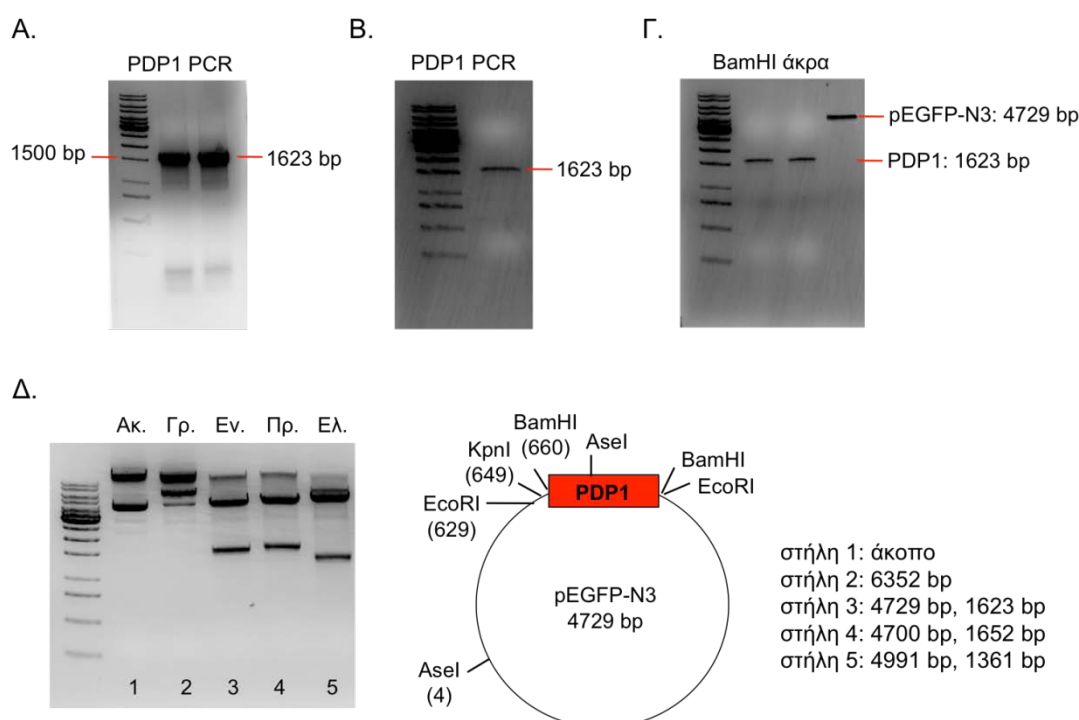
Για να μελετηθεί περαιτέρω η ρύθμιση της δράσης των HIF από την PDP1, ήταν απαραίτητη η κλωνοποίηση του γονιδίου της φωσφατάσης σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών, ώστε να είναι εφικτή η υπερέκφραση της σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα.

Το γονίδιο της PDP1 ενισχύθηκε με PCR (Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος B.2.1.1), από ολικό cDNA κυττάρων HeLa και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος B.1.4). Εφόσον ελέγχθηκε η ορθότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR (Εικόνα 66A) στα 1623 ζεύγη βάσεων, αυτό καθαρίστηκε (Εικόνα 66B) και υποβλήθηκε σε κατεργασία με το ένζυμο περιορισμού BamHI, για το σχηματισμό κατάλληλων άκρων για την κλωνοποίηση του στον πλασμιδιακό φορέα στη θέση πέψης της BamHI (Εικόνα 66Γ).

Ο πλασμιδιακός φορέας που επιλέχθηκε για την κλωνοποίηση της PDP1 είναι ο pEGFP-N3, ο οποίος φέρει την περιοχή κλωνοποίησης του ενθέματος πριν την αλληλουχία που κωδικοποιεί την GFP. Έτσι, η PDP1 εκφράζεται σε σύντηξη με τον επίτοπο GFP στο καρβοξυτελικό της άκρο, προκειμένου να μην παρεμποδίζεται η λειτουργικότητα του σήματος μιτοχονδριακού εντοπισμού που φέρει η φωσφατάση στο αμινοτελικό της άκρο (70 πρώτα αμινοξέα).

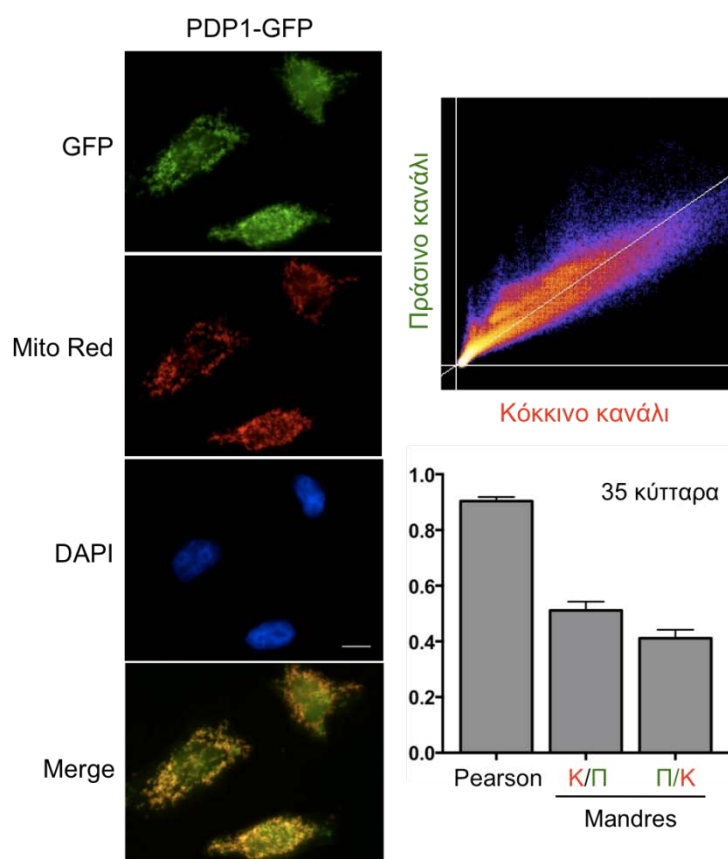
Ο φορέας pEGFP-N3 υποβλήθηκε και αυτός σε πέψη με την ενδονουκλεάση BamHI για το σχηματισμό συμπληρωματικών άκρων με το cDNA της PDP1 (Εικόνα 66Γ), και ακολούθησε αντίδραση λιγάσης για την ένωση των δύο τμημάτων DNA, φορέα και ενθέματος.

Η νέα πλασμιδιακή κατασκευή pEGFP-N3-PDP1 ελέγχθηκε για την ορθότητά της πριν τη χρήση της σε πειράματα διαμόλυνσης των καρκινικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού, BamHI για τον έλεγχο ύπαρξης του ενθέματος μέσα στον πλασμιδιακό φορέα και EcoRI και AseI για τον έλεγχο του σωστού προσανατολισμού του ενθέματος. Όπως φάνηκε μετά από ανάλυση του DNA σε πηκτή αγαρόζης, από τις πέψεις παραλήφθηκαν τμήματα DNA με το αναμενόμενο μέγεθος (Εικόνα 66Δ). Η ορθότητα του πλασμιδίου pEGFP-N3-PDP1 ελέγχθηκε επιπλέον και με αλληλούχιση.



Εικόνα 66: Κλωνοποίηση του γονιδίου της PDP1 στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης: (Α) του προϊόντος της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της PDP1 από ολικό cDNA κυττάρων HeLa, με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών, (Β) μέρους του προϊόντος της PCR μετά την απομόνωση του από την πηκτή αγαρόζης και τον καθαρισμό του, (Γ) του ενθέματος (PDP1) και του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N3 μετά από πέψη με την ενδονουκλεάση BamHI για τον σχηματισμό γραμμικών τμημάτων DNA με συμπληρωματικά μεταξύ τους άκρα, (Δ) του πλασμιδιακού DNA pEGFP-N3-PDP1 που προέκυψε μετά την αντίδραση λιγάσης, απομονώθηκε από βακτηριακούς κλώνους και ελέγχθηκε για την ορθότητά του (στήλη 1: άκοπο, στήλη 2: γραμμικό DNA μετά από πέψη με το ένζυμο KpnI, στήλη 3: έλεγχος εισαγωγής ενθέματος μέσα στον φορέα με πέψη με το ένζυμο BamHI, στήλη 4: έλεγχος του σωστού προσανατολισμού του ενθέματος με πέψη με το ένζυμο EcoRI, στήλη 5: έλεγχος του σωστού προσανατολισμού του ενθέματος με πέψη με το ένζυμο AseI).

Αφού διασφαλίστηκε η ορθότητα της αλληλουχίας του γονιδίου *PDP1*, ελέγχθηκε η έκφραση του προϊόντος PDP1-GFP που εκφράζεται από το νέο πλασμίδιο pEGFP-N3-PDP1. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τη νέα πλασμιδιακή κατασκευή και εξετάστηκε αν η PDP1-GFP εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, όπως η ενδογενής φωσφατάση. Πειράματα φθορισμού έδειξαν ότι το σήμα φθορισμού της PDP1-GFP (πράσινο κανάλι) συνεντοπίζεται με το σήμα της φθορίζουσας ουσίας Mito Red που χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση των μιτοχονδρίων (κόκκινο κανάλι), όπως μαρτυρά και η συγχώνευση των φωτογραφιών από τα δύο χωριστά κανάλια (Εικόνα 67, merge). Άρα η PDP1-GFP σωστά εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, όπου και θα είναι δυνατόν να επιτελεί το ρόλο της στη ρύθμιση της λειτουργίας του PDC.

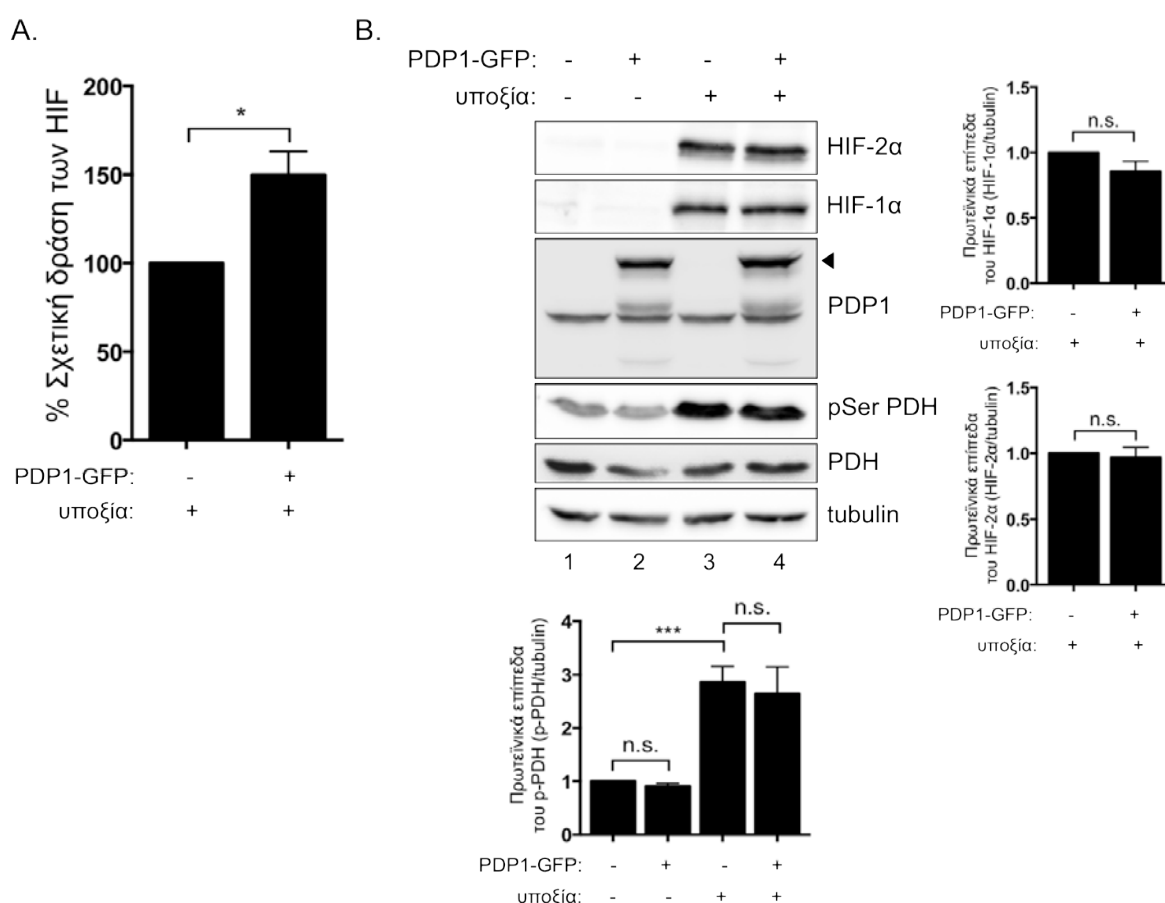


Εικόνα 67: Η χημεική πρωτεΐνη PDP1-GFP εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Μικροσκοπία φθορισμού σε κύτταρα HeLa που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pEGFP-N3-PDP1. Η παρατήρηση του φθορισμού της GFP γίνεται στο πράσινο κανάλι και των μιτοχονδρίων με τη χρήση του Mito Red στο κόκκινο κανάλι. Στην τελευταία εικόνα (merge) παρουσιάζεται η συγχώνευση των δύο εικόνων για την εκτίμηση του συνεντοπισμού των σημάτων φθορισμού. Με DAPI επισημαίνονται οι πυρήνες. Η κλίμακα ορίστηκε στα 10 μ M. Η ανάλυση του συνεντοπισμού της PDP1-GFP με τα μιτοχόνδρια έγινε από τις εικόνες της μικροσκοπίας φθορισμού. Το scatterplot αντιπροσωπεύει την αλληλοεπικάλυψη των pixel του πράσινου καναλιού (PDP1-GFP) και του κόκκινου καναλιού (μιτοχόνδρια, Mito Red), των εικόνων που φαίνονται αριστερά. Το διάγραμμα απεικονίζει

το συντελεστή συσχέτισης Pearson και το συντελεστή συνεντοπισμού Manders, όπως μετρήθηκαν από συνολικό αριθμό 35 κυττάρων, τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων (μέσος όρος \pm s.e.m.).

Γ.1.3.6 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της PDP1-GFP στη ρύθμιση των HIF και στη λειτουργία του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, σε συνθήκες υποξίας

Για τη μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της PDP1-GFP στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης της PDP1-GFP ή τον άδειο φορέα pEGFP-N3 και τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης. Η μέτρηση της δράσης της λουσιφεράσης έδειξε ότι η υπερέκφραση της φωσφατάσης προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της δράσης των HIF στην υποξία (Εικόνα 68A). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη της αποσιώπησης της PDP1.



Εικόνα 68: Η υπερέκφραση της PDP1 αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF και δεν αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της PDH σε συνθήκες υποξίας. (A) Μέτρηση της δράσης της λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa που έχουν διαμολυνθεί με τον άδειο φορέα pEGFP-N3 ή το πλασμίδιο που κωδικοποιεί για την PDP1-GFP και τα πλασμίδια pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pCI-Renilla και επωάστηκαν για 8 ώρες σε νορμοξία (21%

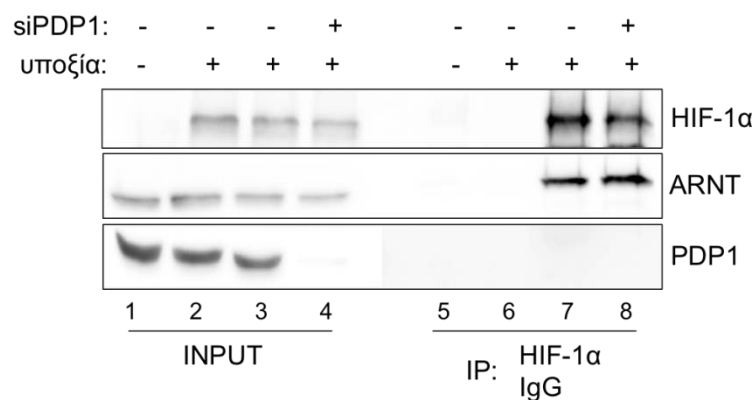
O₂) ή υποξία (1% O₂). Η δράση λουσιφεράσης στην υποξία έχει κανονικοποιηθεί με την αντίστοιχη συνθήκη στη νορμοξία και έχει εκφραστεί ως % σχετική δράση σε σχέση με την κοντρόλ συνθήκη της υποξίας (κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τον άδειο φορέα = 100%). Οι τιμές του διαγράμματος αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που κατεργάστηκαν όπως στο (A). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-1α, HIF-2α, PDP1, PDH, pPDH, και τουμπουλίνης ανιχνεύθηκαν με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των HIF-1α, HIF-2α και pPDH από τρία ανεξάρτητα πειράματα ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας τα επίπεδα της τουμπουλίνης για την κανονικοποίηση τους (-/+ s.e.m., *: P<0.05, ***: P<0.001).

Παρόλα αυτά, η υπερέκφραση της PDP1-GFP δεν φάνηκε να επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 68B, διαδρομή 4 σε σχέση με διαδρομή 3 και αντίστοιχα διαγράμματα), σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που κατεργάστηκαν όπως προηγουμένως. Στα εκχυλίσματα ανιχνεύθηκαν τόσο η ενδογενής PDP1 στα 50 kDa όσο και η χμιαϊκή PDP1-GFP στα 78 kDa (επισημαίνεται με βέλος) (Εικόνα 68B), για τον έλεγχο της υπερέκφρασης.

Παράλληλα, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης PDH. Όπως παρατηρήθηκε και προηγουμένως (παράγραφος Γ.1.3.4), η φωσφορυλίωση της PDH επάχθηκε 3-4 φορές στην υποξία σε σχέση με τη νορμοξία, ενώ μετά από υπερέκφραση της PDP1-GFP, τα επίπεδα της pPDH δε μεταβλήθηκαν ούτε σε νορμοξία ούτε σε υποξία, σε σχέση με την εκάστοτε συνθήκη αναφοράς (Εικόνα 68B, διαδρομή 4 σε σχέση με διαδρομή 3 και σύγκριση διαδρομής 2 με τη διαδρομή 1 και αντίστοιχο διάγραμμα). Έτσι, η λειτουργία του PDC δε φαίνεται να επηρεάζεται.

Γ.1.3.7 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της PDP1 με τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας

Προκειμένου να διαλευκανθεί αν η PDP1 αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και άρα ρυθμίζει τη δράση του αποφωσφορυλιώνοντάς τον άμεσα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης του ενδογενούς HIF-1α από εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, τα οποία διαμολύνθηκαν με το siRNA της PDP1 ή το κοντρόλ siRNA και επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας. Παρατηρήθηκε ότι η PDP1 αποσιωπήθηκε επιτυχώς (Εικόνα 69, διαδρομή 4), και ότι δεν κατακρημνίστηκε μαζί με τον HIF-1α στις κοντρόλ συνθήκες υποξίας (Εικόνα 69, διαδρομή 7), γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι μάλλον η φωσφατάση δεν αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και ότι ρυθμίζει τη δράση του με κάποιον έμμεσο μηχανισμό. Ο ARNT κατακρημνίστηκε από τον HIF-1α, γεγονός που δείχνει την επιτυχία του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης. Επίσης, το σύμπλοκο HIF-1α-ARNT δεν επηρεάστηκε από την αποσιώπηση της PDP1, όπως παρατηρήθηκε και στην παράγραφο Γ.1.3.3.



Εικόνα 69: Η PDP1 δεν αλληλεπιδρά με τον HIF-1α στην υποξία. Ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιώντας αντίσωμα ενάντια στον HIF-1α (5^η, 7^η, 8^η διαδρομή) ή IgG από ορό κουνελιού (6^η διαδρομή). Τα διαλυτά κλάσματα (inputs) και οι πρωτεΐνες που ανοσοκατακρημνίστηκαν μαζί με τον HIF-1α (IP), από κύτταρα HeLa που έχουν επωαστεί παρουσία ή απουσία του siRNA της PDP1 και επώαστηκαν για 8 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και υποξίας (1% O₂), αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντισώματα.

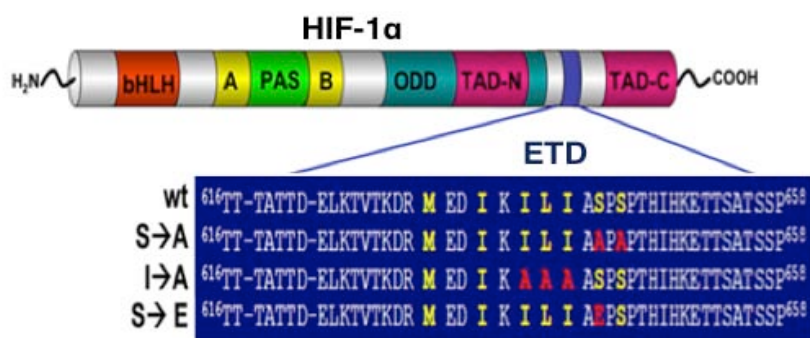
Γ.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΠΟΞΙΑΣ, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ, ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ETD (ERK TARGETED DOMAIN) ΤΟΥ HIF-1α

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (παράγραφος Α.7), ο HIF-1α έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου και έχει συσχετιστεί με αυξημένη επιθετικότητα του όγκου, γι'αυτό αποτελεί ελκυστικό στόχο των στρατηγικών αντικαρκινικής θεραπείας. Στο εργαστήριο Βιοχημείας (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) δείχθηκε ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α στα κατάλοιπα Ser641 και Ser643 από τις ERK1/2 ενεργοποιεί τον HIF-1, καθώς εξυπηρετεί τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα (34, 127). Έτσι λοιπόν, το δεύτερο στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2, στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και στην προώθηση της ογκογένεσης. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η επίδραση της παρεμπόδισης της φωσφορυλίωσης αυτής, στη διεκπεραίωση σημαντικών βιολογικών λειτουργιών των καρκινικών κυττάρων και στην επιβίωσή τους στην υποξία. Για την παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης δε χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστοί αναστολείς του μονοπατιού των MAPK (PD98059 αναστολέα της MEK1, U0126 αναστολέα των ERK1/2), αλλά κατασκευάστηκαν νέοι πεπτιδικοί αναστολείς, οι οποίοι προέρχονται από δομικές/λειτουργικές περιοχές του ίδιου του HIF-1α.

Η δημιουργία των πεπτιδικών αναστολέων βασίστηκε στο ερώτημα, αν θα μπορούσε να κατασκευαστεί κάποιος ανταγωνιστής της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2, ο οποίος θα ήταν ικανός να στοχεύει τη συγκεκριμένη λειτουργική περιοχή του HIF-1α αναστέλλοντας, έτσι, τη δράση του HIF-1 ειδικά. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η μικρή περιοχή ETD (ERK Targeted Domain, 616-658) του HIF-1α, η οποία αποτελεί το υπόστρωμα των ERK1/2, καθώς περιλαμβάνει τις θέσεις-στόχους των ERK1/2 και το γειτονικό σε αυτές σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (NES). Σε προκαταρκτικά πειράματα που διεξάχθηκαν από την Δρ. Μαρία Κούρτη, διαφορετικές μορφές της περιοχής ETD, οι οποίες περιλαμβάνουν εκτός από την αγρίου τύπου μορφή, μια μορφή στην οποία έχουν καταργηθεί οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK (ETD SA), μια φωσφομιμητική μορφή (ETD SE), καθώς και τη μορφή στην οποία έχει καταστραφεί το σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (ETD IA) (286) (Εικόνα 70), εκφράστηκαν σε καρκινικά κύτταρα σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG. Προέκυψε ότι οι μορφές της περιοχής ETD που φέρουν λειτουργικές θέσεις

φωσφορυλίωσης ή μιμούνται τη φωσφορυλίωση, αναστέλλουν έντονα τη μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1 σε συνθήκες υποξίας (286).

Παρόλα αυτά, η διαδικασία διαμόλυνσης των καρκινικών κυττάρων με το cDNA που κωδικοποιεί τα πεπτίδια ETD, δεν αποτελεί πρακτικό τρόπο και δεν εφαρμόζεται για τη χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών και πεπτιδίων-ανατολέων στα κύτταρα ενός όγκου, καθώς μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες παρενέργειες (273). Έτσι, για την αποτελεσματική είσοδο των διαφόρων μορφών της περιοχής ETD στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της πρωτεϊνικής μεταγωγής, η οποία είναι πολύ διαδεδομένη τα τελευταία χρόνια. Όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην εισαγωγή (παράγραφος Α.9), η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην ικανότητα κάποιων πρωτεϊνών ιικής προέλευσης να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκει και η πρωτεΐνη TAT του ιού HIV. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η περιοχή PTD (Protein Transduction Domain) της πρωτεΐνης TAT. Πρόκειται για ένα κατιονικής φύσης πεπτίδιο αποτελούμενο από 9 αμινοξέα, πλούσιο σε αργινίνες και λυσίνες (RKKRRQRRR). Αυτό το μικρό πεπτίδιο χρησιμοποιείται σε σύντηξη με μεγαλομόρια, ώστε να διευκολύνει τη διείσδυσή τους στα κύτταρα μέσω ενδοκύττωσης και συγκεκριμένα με μακροπινοκύτωση (277). Για το σκοπό αυτό, ήταν απαραίτητο οι διάφορες μορφές του πεπτιδίου ETD (wt, SA, SE, IA) να εκφραστούν σε σύντηξη τόσο με το πεπτίδιο TAT, όσο και με τον επίτοπο FLAG, ο οποίος θα διευκολύνει την ανίχνευση τους μέσα στα κύτταρα.

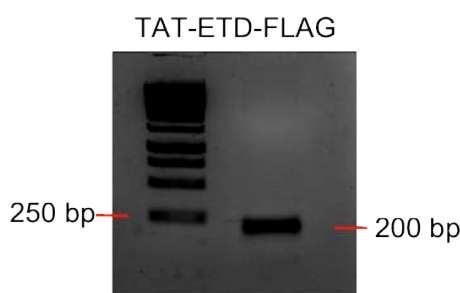


Εικόνα 70: Οι αμινοξικές αλληλουχίες της αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της περιοχής ETD (ERK Targeted Domain) του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG. Οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 και το NES επισημαίνονται με κίτρινο χρώμα. Το κόκκινο χρώμα υποδεικνύει τα αμινοξέων που εισάχθηκαν με μεταλλαξιγένεση: στην SA μορφή οι 2 σερίνες-στόχοι των ERK1/2 (641 και 643) έχουν αντικατασταθεί από αλανίνες, στην IA μορφή οι 3 ισολευκίνες που απαρτίζουν το υδρόφοβο σήμα εξόδου από τον πυρήνα (NES) έχουν αντικατασταθεί από αλανίνες και τέλος στην SE μορφή η μια σερίνη 641 έχει μεταλλαχθεί σε γλουταμινικό οξύ, το φορτίο του οποίου μιμείται αυτό της φωσφορικής ομάδας (34).

Γ.2.1 Κατασκευή και καθαρισμός των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG

Γ.2.1.1 Κλωνοποίηση του cDNA των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1

Για την ενίσχυση των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου ETD, χρησιμοποιήθηκαν σαν εκμαγείο τα πλασμίδια που εκφράζουν τις μορφές αυτές του πλήρους μεγέθους HIF-1α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG (pcDNA 3.1-FLAG-HIF-1α wt/SA/SE/IA) και κατάλληλοι εκκινητές (Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος Β.1.4). Στην εικόνα 71 παρουσιάζεται ο έλεγχος της ορθότητας του προϊόντος της PCR.



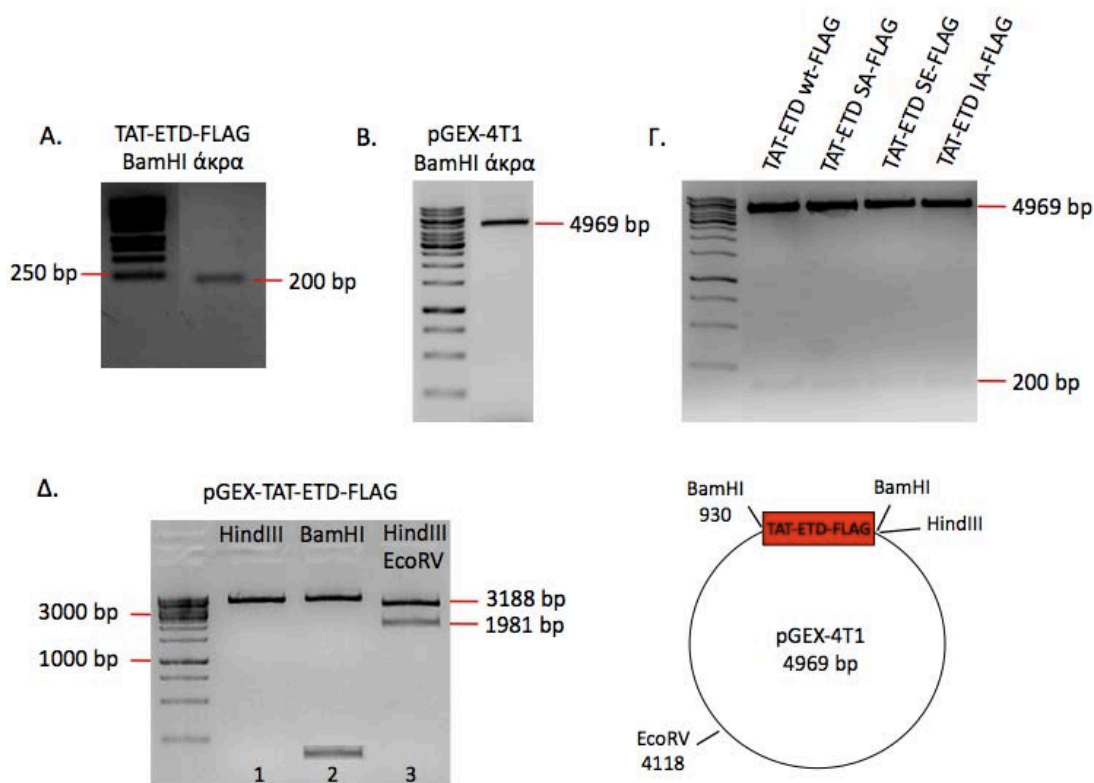
Εικόνα 71: Ενίσχυση του cDNA των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG με PCR. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης του προϊόντος της PCR (αντιπροσωπευτική εικόνα για τη μορφή αγρίου τύπου / wt).

Από την αντίδραση της PCR προέκυψε για κάθε μορφή του πεπτιδίου ένα μοναδικό και καθαρό προϊόν, μεγέθους περίπου 200 ζευγών βάσεων. Το προϊόν της PCR στη συνέχεια απομονώθηκε από την πηκτή, καθαρίστηκε και υποβλήθηκε σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BamHI, προκειμένου να σχηματιστούν τα κατάλληλα ελεύθερα άκρα για την κλωνοποίηση του στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1, ο οποίος κατεργάστηκε με τον ίδιο τρόπο. Με το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης που ακολούθησε, μετασχηματίστηκαν βακτηριακά κύτταρα Top10 *E. coli* και από επιλεγμένους κλώνους απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA pGEX-4T1-TAT-ETD-FLAG σε καθαρή μορφή.

Ακολούθησε έλεγχος της ορθότητας των νέων πλασμιδιακών κατασκευών, με πέψεις με κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Για το σκοπό αυτό, έγινε κατεργασία με τα ένζυμα HindIII για γραμμικό τμήμα DNA (5169 ζεύγη βάσεων), BamHI για την παραλαβή δύο τμημάτων που αντιστοιχούν στον φορέα (4969 ζεύγη βάσεων) και το ένθεμα (200 ζεύγη βάσεων) και με το συνδυασμό των ενζύμων HindIII και EcoRV για τον έλεγχο του σωστού

προσανατολισμού του ενθέματος, από την οποία επίσης προκύπτουν δύο τμήματα μεγέθους 3188 και 1981 ζευγών βάσεων.

Σε κάθε περίπτωση, από τις πέψεις παραλήφθηκαν τμήματα DNA με το σωστό μέγεθος. Τα στάδια της κλωνοποίησης του cDNA των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1 φαίνονται στην εικόνα 72.



Εικόνα 72: Κλωνοποίηση του cDNA των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης: (Α) του ενθέματος TAT-ETD-FLAG (αντιπροσωπευτική εικόνα από την αγρίου τύπου μορφή) και (Β) του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1 μετά από πέψη με την ενδονουκλεάση BamHI για τον σχηματισμό γραμμικών τμημάτων DNA με συμπληρωματικά μεταξύ τους άκρα, (Γ) του πλασμιδιακού DNA για τις διάφορες μορφές του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG που απομονώθηκε από βακτηριακούς κλώνους και ελέγχθηκε για την εισαγωγή ενθέματος μέσα στον φορέα με πέψη με το ένζυμο BamHI, (Δ) του καθαρού πλασμιδίου pGEX-4T1-TAT-ETD-FLAG μετά από κατεργασία με τα ένζυμα HindIII (διαδρομή 1, για γραμμικό DNA), BamHI (διαδρομή 2, για έλεγχο ενθέματος) και το συνδυασμό των ενζύμων HindIII και EcoRV (διαδρομή 3, για έλεγχο του σωστού προσανατολισμού το ενθέματος μέσα στον πλασμιδιακό φορέα).

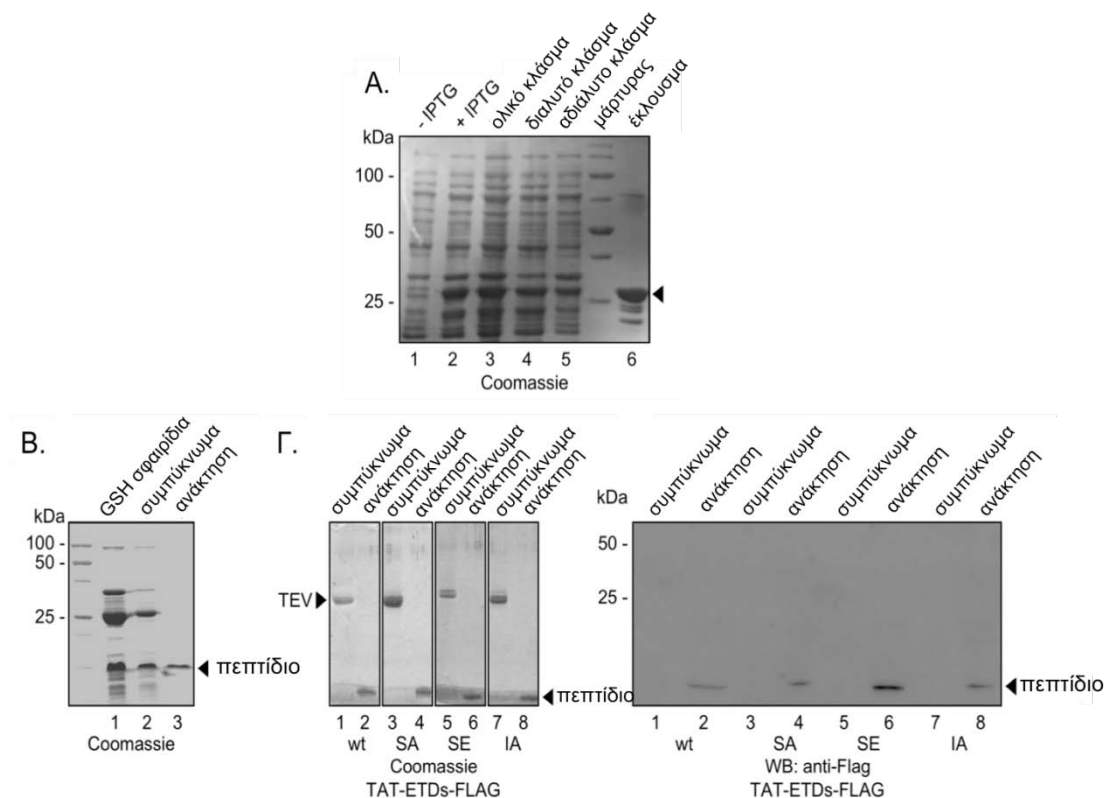
Πριν τη χρήση των νέων πλασμιδίων για την υπερέκφραση των διαφόρων μορφών των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG σε βακτηριακά κύτταρα, το πλασμιδιακό DNA ελέγχθηκε περαιτέρω και με αλληλούχιση, ώστε να διευκρινιστεί ότι δεν έχει εισαχθεί κάποια τυχαία μετάλλαξη στην αλληλουχία του DNA κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κλωνοποίησης. Τα

αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν ότι τα πλασμίδια έκφρασης των πεπτιδίων είναι σωστά.

Γ.2.1.2 Καθαρισμός των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG

Με τα πλασμίδια pGEX-4T1-TAT-ETD-FLAG, μετασχηματίστηκαν βακτηριακά κύτταρα BL21RIL *E. coli* και πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης των διαφόρων μορφών των πεπτιδίων με IPTG, σε συνθήκες που περιγράφηκαν αναλυτικά στα Υλικά και Μέθοδοι (παράγραφος Β.2.2). Έτσι, οι διάφορες μορφές της περιοχής ETD του HIF-1α εκφράστηκαν σε σύντηξη με την GST και το πεπτίδιο TAT στο αμινοτελικό τους άκρο, και τον επίτοπο FLAG στο καρβοξυτελικό τους άκρο.

Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πεπτιδίων GST-TAT-ETD-FLAG από τις υπόλοιπες βακτηριακές πρωτεΐνες και ο καθαρισμός τους, πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία αγκιστείας και τη χρήση σφαιριδίων γλουταθειόνης αγαρόζης (Εικόνα 73Α). Στη συνέχεια, τα καθηλωμένα στα σφαιρίδια πεπτίδια TAT-ETD-FLAG αποκόπηκαν από την GST με τη χρήση της πρωτεάσης TEV (Εικόνα 73Β), η οποία αναγνωρίζει μια αλληλουχία που κωδικοποιείται από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1 και βρίσκεται μεταξύ της GST και του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG. Η πρωτεάση TEV (~28 kDa) διαχωρίστηκε από τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG (~7 kDa, Πίνακας 10) με υπερδιήθηση (Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος Β.2.3). Με SDS-PAGE ανάλυση παρατηρήθηκε η ανάκτηση των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG σε καθαρή μορφή (Εικόνα 73Γ).



Εικόνα 73: Έκφραση και καθαρισμός των κυτταροδιδευτικών TAT-ETD-FLAG πεπτιδίων . (Α) Αντιπροσωπευτική απεικόνιση της πρωτεϊνικής έκφρασης των GST-TAT-ETD-FLAG (από την wt μορφή). BL21RIL *E. coli* κύτταρα μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια pGEX-4T1-TAT-ETD-FLAG και επώστηκαν απουσία (-, διαδρομή 1) ή παρουσία (+, διαδρομή 2) IPTG. Το κυτταρικό εκχύλισμα (διαδρομή 3), το διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα (διαδρομή 4), το αδιάλυτο κλάσμα πρωτεϊνών (διαδρομή 5) και η έκλουση από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης αгарόζης (διαδρομή 7) αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και βάφθηκαν με Coomassie. (Β) Αντιπροσωπευτική εικόνα των σταδίων απομόνωσης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG από το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των βακτηριακών κυττάρων (από την wt μορφή). Η GST-TAT-ETD-Flag (wt) πρωτεΐνη δεσμεύτηκε σε σφαιρίδια γλουταθειόνης αгарόζης και επώστηκε για 16 ώρες με την πρωτεάση TEV στους 4°C (διαδρομή 1). Τα TAT-ETD-Flag πεπτίδια (διαδρομή 3) διαχωρίστηκαν από την πρωτεάση TEV (διαδρομή 2) με υπερδιήθηση (διέλευση από στήλη microcon- 10@ centrifugal filter). Δείγματα από κάθε στάδιο αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και βάφθηκαν με Coomassie. (Γ) Χρώση με Coomassie (αριστερά) ή ανοσοανίχνευση με αντίσωμα ενάντια στον επίτοπο FLAG (δεξιά) όλων των μορφών των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG που απομονώθηκαν όπως στο Α και Β (σε κάθε πεπτιδική μορφή αντιστοιχούν δύο διαδρομές, όπως αριθμούνται στο κάτω μέρος της εικόνας, που παρουσιάζουν τα εκλούσματα που προέκυψαν μετά την επώαση με την TEV και τα πεπτίδια σε καθαρή μορφή απαλλαγμένα από την πρωτεάση).

Μετά την ολοκλήρωση όλων των παραπάνω σταδίων, μετρήθηκε η συγκέντρωση των καθαρών πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG και υπολογίστηκε η απόδοση της διαδικασίας καθαρισμού για τις διάφορες πεπτιδικές μορφές (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Η απόδοση του καθαρισμού όλων των μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG εκφρασμένη σε μg , από συνολικό όγκο καλλιέργειας 1,5 λίτρο.

Όνομα	Απόδοση καθαρισμού (συνολικά μg)
TAT-ETD wt-FLAG	809,5
TAT-ETD SA-FLAG	802
TAT-ETD SE-FLAG	933
TAT-ETD IA-FLAG	957

Γ.2.2 Έλεγχος της ικανότητας διείσδυσης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG σε κύτταρα Huh7 και της επίδρασής τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF

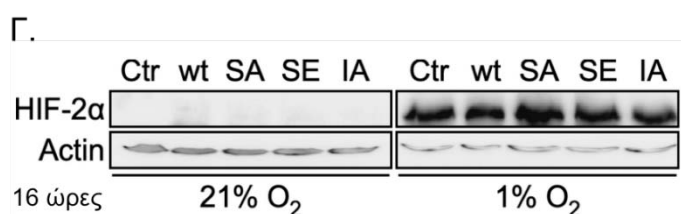
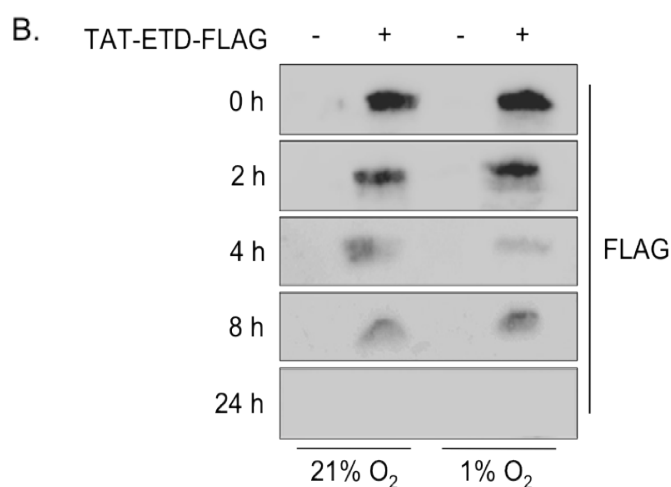
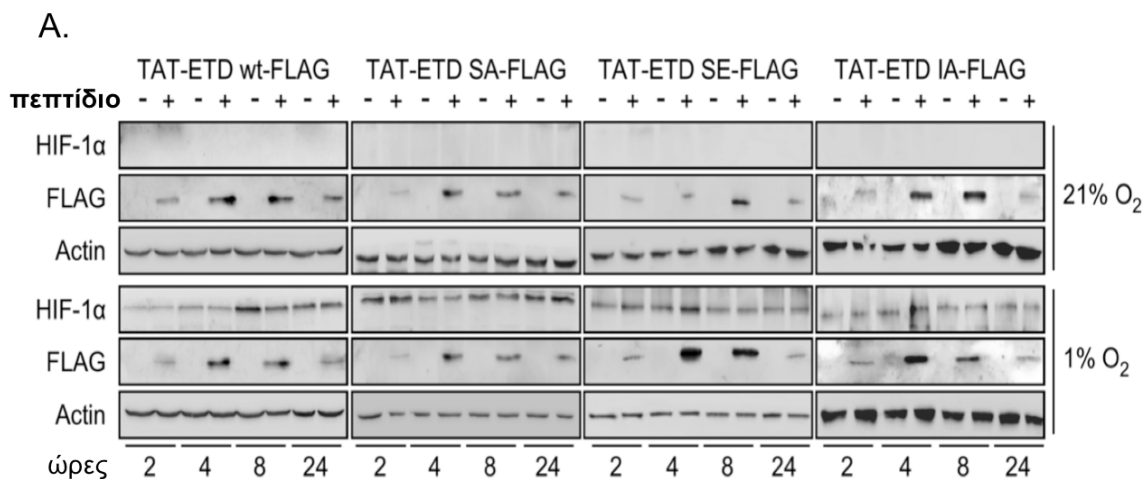
Αρχικά, τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να διεισδύουν στα καρκινικά κύτταρα Huh7. Τα πεπτίδια προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο των καλλιιεργειών σε τελική συγκέντρωση 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Οι μορφές του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG. Αναγράφεται το μοριακό βάρος (σε Da) και η μοριακότητα της κάθε μορφής που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ η οποία χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα. Η αμινοτελική TAT και η καρβοξυτελική FLAG αλληλουχία επισημαίνονται με έντονα γράμματα. Οι μεταλλάξεις των θέσεων φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 και των υδρόφοβων αμινοξέων του NES φαίνονται με υπογράμμιση.

Όνομα	Αλληλουχία (68 αμινοξέα), pI=10,5	Μέγεθος (Dalton)	Μοριακότητα (nM)
wt	GMHMSSGR KRRQRR TTTTATTDELKTVTKDR MEDIKILIASPSPTHIHKETTSATSSPDY KDDDDKL	7764	387
SA	GMHMSSGR KRRQRR TTTTATTDELKTVTKDR MEDIKILIA <u>AP</u> APTHIHKETTSATSSPDY KDDDDKL	7732	388
SE	GMHMSSGR KRRQRR TTTTATTDELKTVTKDR MEDIKILIA <u>EP</u> SPTHIHKETTSATSSPDY KDDDDKL	7806	384
IA	GMHMSSGR KRRQRR TTTTATTDELKTVTKDR MEDIK <u>AAA</u> ASPSPTHIHKETTSATSSPDY KDDDDKL	7638	393

Μετά από λύση των κυττάρων και ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων με ανοσοαποτύπωση, τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε υποξία, όλες οι πεπτιδικές μορφές ανιχνεύθηκαν μέσα στα κύτταρα ήδη από τις πρώτες 2 ώρες μετά την προσθήκη τους στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, εμφάνισαν τη μέγιστη ενδοκυττάρια συγκέντρωση στις 4-8 ώρες, και ανιχνεύθηκαν μικρότερα επίπεδά τους στο εσωτερικό των κυττάρων ακόμη και

μετά από 24 ώρες (Εικόνα 74A). Αυτή η σταδιακή μετάβαση των πεπτιδίων από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας στο εσωτερικό των κυττάρων έγινε εμφανής και μετά από εξέταση της παρουσίας τους στο υπερκείμενο της καλλιέργειας. Στις 2 ώρες η συγκέντρωση των πεπτιδίων στο υπερκείμενο είναι μεγάλη, στις 4-8 ώρες μειώνεται σημαντικά, καθώς το μεγαλύτερο μέρος των μορίων έχουν ήδη εισέλθει στα κύτταρα, ενώ στις 24 ώρες δεν ανιχνεύονται πλέον πεπτίδια στο θρεπτικό μέσο (Εικόνα 74B).



Εικόνα 74: Τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG διεισδύουν στα κύτταρα Huh7 και δεν επηρεάζουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες υποξίας. 3 μg/ml της κάθε πεπτιδικής μορφής προστέθηκαν στο μέσο της καλλιέργειας κυττάρων Huh7, και τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και υποξίας (1% O₂) για τις χρονικές περιόδους που αναγράφονται. Με ανοσοαποτύπωση

κατά Western και τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στον HIF-1α, τον HIF-2α, τον επίτοπο FLAG και την ακτίνη, αναλύθηκαν (Α) τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, (Β) το υπερκείμενο της καλλιέργειας των κυττάρων, (ενδεικτικά από τη μορφή TAT-ETD wt-FLAG) και (Γ) τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα.

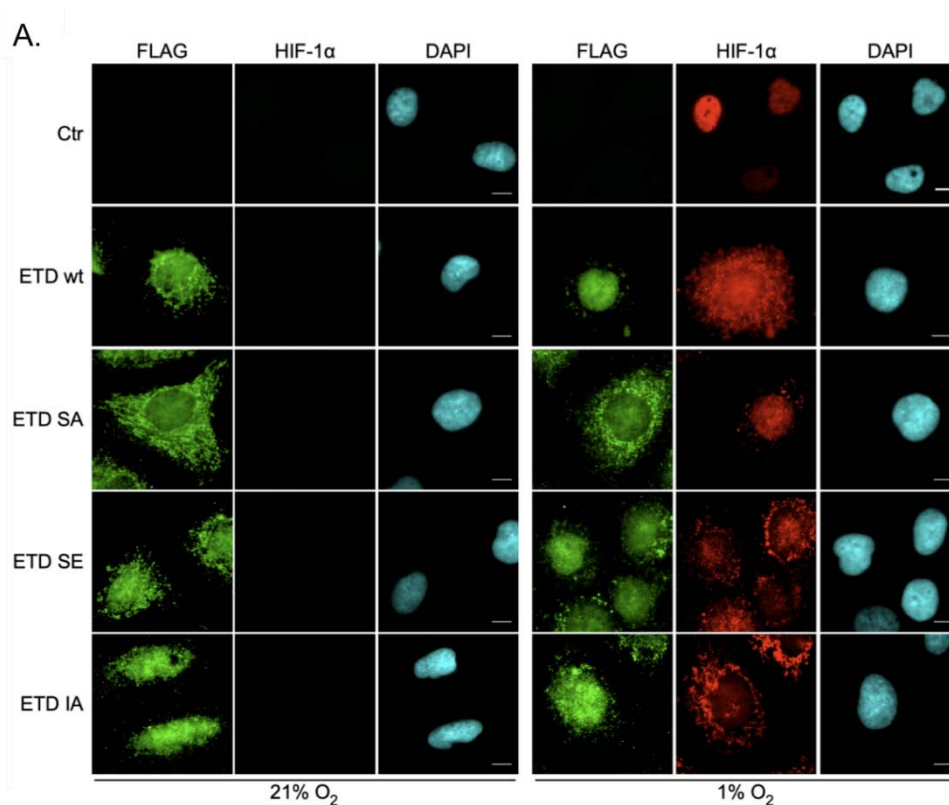
Σε όλα τα χρονικά σημεία που εξετάστηκαν, σε συνθήκες υποξίας, η επαγωγή του ενδογενούς HIF-1α δεν επηρεάστηκε από την διείσδυση των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG στα κύτταρα (Εικόνα 74Α), καθώς τα πρωτεϊνικά του επίπεδα σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη ελέγχου δε μεταβλήθηκαν. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τον HIF-2α, ο οποίος φάνηκε να εκφράζεται κανονικά στα κύτταρα Huh7 σε συνθήκες υποξίας και τα πρωτεϊνικά του επίπεδα παρέμειναν ανεπηρέαστα παρουσία των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου ETD (Εικόνα 74Γ).

Γ.2.3 Μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στο εσωτερικό των κυττάρων και της επίδρασής τους στον εντοπισμό του HIF-1α

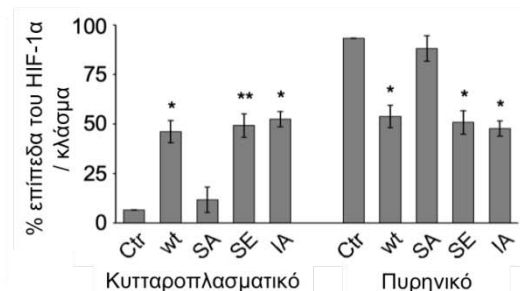
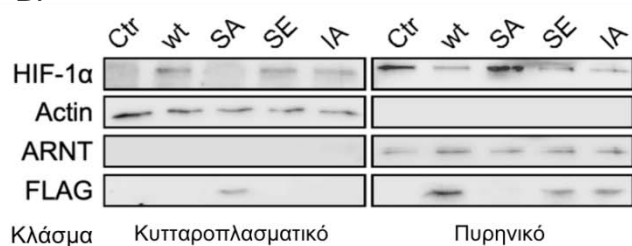
Εφόσον τα πεπτιδία TAT-ETD-FLAG είναι ικανά να διεισδύσουν στα κύτταρα, ελέγχθηκε ο εντοπισμός τους στο εσωτερικό των κυττάρων Huh7. Πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι οι μορφές του πεπτιδίου που μπορούν να φωσφορυλιωθούν (wt και ΙΑ) ή μιμούνται τη φωσφορυλίωση (SE), εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα, ενώ η μορφή στην οποία έχουν μεταλλαχθεί οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (SA) εμφανίστηκε κυτταροπλασματική (Εικόνα 75Α, πράσινο κανάλι).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι πυρηνικές μορφές του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG (wt, SE, ΙΑ) προκάλεσαν τη μετατόπιση μεγάλου κλάσματος του ενδογενούς HIF-1α στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα, επίδραση με την κυτταροπλασματική SA μορφή δε μετέβαλλε τον πυρηνικό εντοπισμό του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 75Α, κόκκινο κανάλι).

Η μετατόπιση του ενδογενούς HIF-1α από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα παρουσία των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG (wt, SE, ΙΑ), επιβεβαιώθηκε και με πειράματα βιοχημικής κλασμάτωσης. Οι πυρηνικές πεπτιδικές μορφές προκάλεσαν τη μείωση της συγκέντρωσης του HIF-1α στο πυρηνικό κλάσμα των κυττάρων και την αύξησή του στο κυτταροπλασματικό κλάσμα (Εικόνα 75Β).



B.



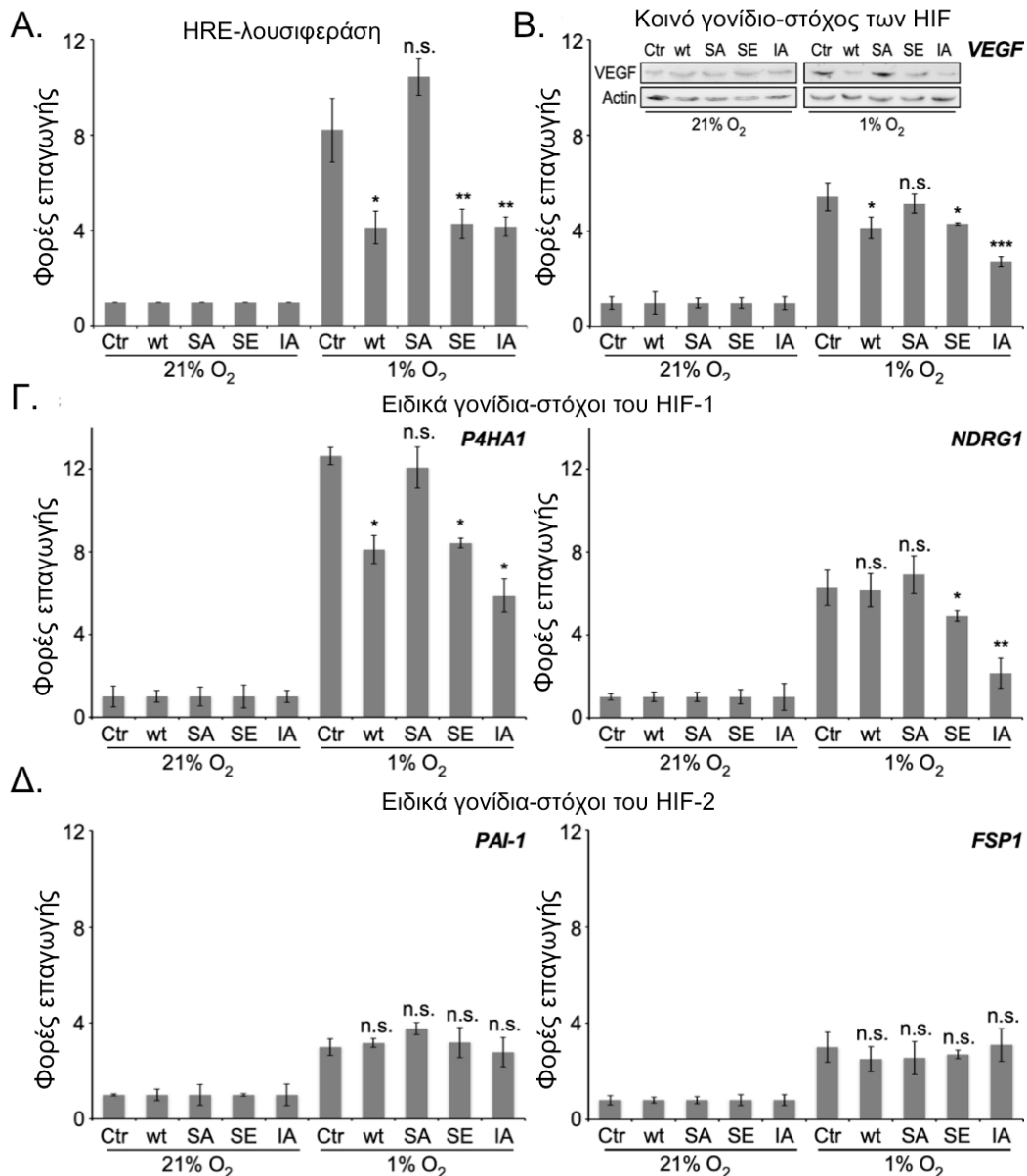
Εικόνα 75: Η διείσδυση των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στα κύτταρα Huh7 μεταβάλλει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α σε συνθήκες υποξίας. 3 μg/ml της κάθε μορφής του πεπτιδίου TAT-ETD-Flag προστέθηκαν στο μέσο της καλλιέργειας κυττάρων Huh7, και μετά από 1 ώρα τα κύτταρα επωάστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και υποξίας (1% O₂) για 8 (A) ή 4 (B) ώρες. (A) Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για την παρατήρηση των κυτταροδιεισδυτικών πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG (πράσινο κανάλι) και του HIF-1α (κόκκινο κανάλι), με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων ενάντια στον επίτοπο FLAG και τον HIF-1α αντίστοιχα. Με DAPI έγινε χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Η κλίμακα ορίστηκε σε 10 μM. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western των υποκυτταρικών κλασμάτων (αριστερά), με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στον HIF-1α και τον επίτοπο FLAG. Η ακτίνη και ο ARNT χρησιμοποιήθηκαν ως κοντρόλ της διαδικασίας κλασμάτωσης. Η ποσοτική ανάλυση (δεξιά) της ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζει το ποσοστό των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α σε κάθε κλάσμα μετά από κατεργασία με τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG και αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων (n=9, +/- s.e.m., *: P<0.05, **: P<0.01, σε σύγκριση με το αντίστοιχο κοντρόλ της νορμοξίας ή της υποξίας)

Γ.2.4 Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1

Καθώς ο πυρηνικός εντοπισμός των μεταγραφικών παραγόντων είναι απαραίτητος για να εξασκήσουν τη δράση τους, διερευνήθηκε εάν η παρατηρούμενη μεταβολή του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-1α, λόγω της επώασης με τα κυτταροδιεισδυτικά πεπτίδια, επηρέασε τη μεταγραφική του ενεργότητα, σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν σε υποξία. Συγκεκριμένα, από πειράματα μέτρησης της δράσης της λουσιφεράσης, η επαγωγή της οποίας ελέγχεται από 5 HRE, φάνηκε ότι η επίδραση με τις πυρηνικές μορφές του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG (wt, SE, IA) προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στην εξαρτώμενη από τα HRE μεταγραφική ενεργότητα σε συνθήκες υποξίας, ενώ η κυτταροπλασματική SA μορφή λειτούργησε σαν αρνητικό κοντρόλ και δεν επηρέασε την δράση των HIF (Εικόνα 76Α).

Για να επιβεβαιωθεί η επίδραση των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στη δράση των HIF, μελετήθηκε η μεταγραφή γνωστών γονιδίων-στόχων της υποξίας, σε κύτταρα που έχουν επωαστεί παρουσία των πεπτιδίων. Παρατηρήθηκε ότι τόσο τα πρωτεϊνικά επίπεδα όσο και η μεταγραφή του γονιδίου *VEGF*, που αποτελεί κοινό γονίδιο-στόχο των HIF-1 και HIF-2, όντως μειώθηκαν μετά από επίδραση με τα πυρηνικά πεπτίδια (wt, SE, IA, με τη μορφή TAT-ETD IA-FLAG να είναι η πιο δραστική), αλλά όχι από την κυτταροπλασματική SA μορφή (Εικόνα 76Β).

Προκειμένου να διευκρινιστεί ποια από τις ισομορφές των HIF επηρεάζεται από τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης των επιπέδων mRNA ειδικών γονιδίων-στόχων των HIF-1 και HIF-2, με qRT-PCR. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG, δεν προκάλεσαν καμία μεταβολή στα επίπεδα mRNA των γονιδίων που ελέγχονται αποκλειστικά από τον HIF-2 (*PAI-1* και *FSP1*), καθώς η αλληλουχία της περιοχής ETD δεν είναι συντηρημένη στον HIF-2α (10, 287) (Εικόνα 76Δ). Αντίθετα, οι πυρηνικές μορφές του πεπτιδίου (wt, SE, IA) ανέστειλαν σημαντικά τη μεταγραφή των ειδικών γονιδίων-στόχων του HIF-1 (*P4HA1* και *NDRG1*) (243, 288). Τόσο στην περίπτωση του *P4HA1* όσο και του *NDRG1*, η μορφή TAT-ETD SA-FLAG εμφανίστηκε ανενεργή, ενώ η μορφή TAT-ETD IA-FLAG ήταν ο πιο ισχυρός αναστολέας της μεταγραφής που ελέγχεται από τον HIF-1 (Εικόνα 76Γ).



Εικόνα 76: Οι μορφές των κυτταροδιεισδυτικών πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG που εντοπίζονται στον πυρήνα (wt, SE, IA) αναστέλλουν την εξαρτώμενη από τον HIF-1, αλλά όχι από τον HIF-2 γονιδιακή έκφραση. (Α) Μέτρηση της δράσης λουσιφεράσης σε κύτταρα Huh7 τα οποία είχαν προηγουμένως διαμολυνθεί με τα πλασμίδια pGL3-5xHRE-VEGF-Luc και pCL-Renilla και ακολούθησε επίδραση με 3 $\mu\text{g/ml}$ της εκάστοτε πεπτιδικής μορφής. Τα κύτταρα προ-επώστηκαν για 1 ώρα σε φυσιολογικές συνθήκες και στη συνέχεια για άλλες 16 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και υποξίας (1% O₂). Οι τιμές αποτελούν το λόγο της δράσης της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας προς τη δράση της Renilla λουσιφεράσης και εκφράζονται ως φορές επαγωγής της υποξίας σε σχέση με τη νορμοξία. Αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και σύνολο 9 τιμών. (Β) Μέτρηση των επιπέδων mRNA με qRT-PCR του κοινού γονιδίου-στόχου των HIF *VEGF*, σε κύτταρα Huh7 που κατεργάστηκαν με 3 $\mu\text{g/ml}$ της εκάστοτε πεπτιδικής μορφής 1 ώρα πριν την επώασή τους για 16 ώρες σε νορμοξία και υποξία, σε ένθεση η ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης με ανοσοαποτύπωση κατά Western και τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στον VEGF και την ακτίνη και (Γ-Δ) Μέτρηση των επιπέδων mRNA με qRT-PCR, γνωστών γονιδίων-στόχων της υποξίας: (Γ) των ειδικών γονιδίων-στόχων του HIF-1, *P4HA1* και *NDRG1* και (Δ) των ειδικών γονιδίων-στόχων του HIF-2, *PAI-1* και

FSP1, σε κύτταρα Huh7 που κατεργάστηκαν όπως στο (B). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως φορές επαγωγής της υποξίας σε σχέση με τη νορμοξία και αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και σύνολο 6 τιμών. (-/+ s.e.m., *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, n.s.: μη σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με τη συνθήκη κοντρόλ της υποξίας)

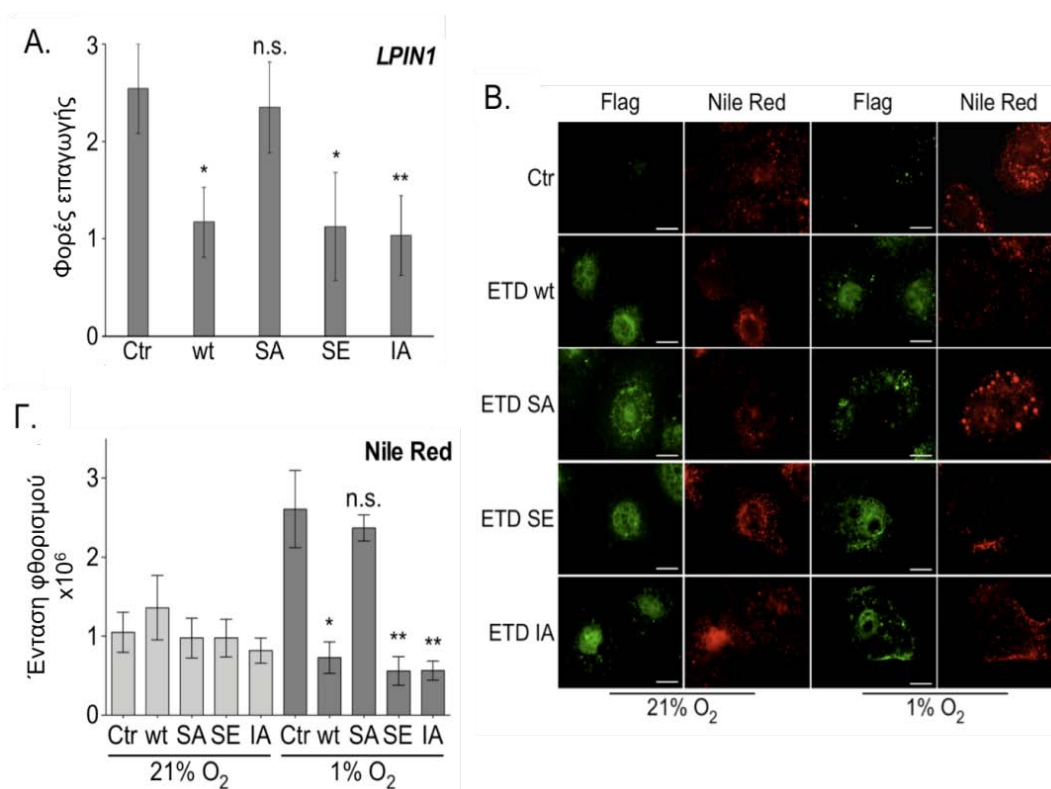
Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, τα κυτταροδιαδυσδυτικά πεπτιδία που προέρχονται από την περιοχή ETD του HIF-1α και διαθέτουν λειτουργικές θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (wt, IA) ή μιμούνται τη φωσφορυλίωση (SE), συσσωρεύονται στον πυρήνα, προκαλούν την εξαγωγή του ενδογενούς HIF-1α στο κυτταρόπλασμα και αναστέλλουν αποκλειστικά τη δράση του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας. Αντίθετα, η μορφή στην οποία έχουν καταργηθεί οι θέσεις φωσφορυλίωσης (SA) εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και δεν επηρεάζει τον HIF-1.

Γ.2.5 Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στο σχηματισμό λιποσταγονιδίων

Εφόσον, από τα μέχρι τώρα δεδομένα, αποδείχθηκε ότι τα πεπτιδία TAT-ETD-FLAG αποτελούν ειδικούς αναστολείς της δράσης του HIF-1, εξετάστηκε αν αυτή η αναστολή επηρεάζει χαρακτηριστικές βιολογικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, οι οποίες διαμεσολαβούνται κατά κύριο λόγο από τον HIF-1. Οι ιδιότητες αυτές διασφαλίζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας, καθώς αποτελούν μηχανισμούς απόκρισης στην έλλειψη οξυγόνου. Μεταξύ των μηχανισμών αυτών συμπεριλαμβάνονται ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού, η μετανάστευση, και η ανθεκτικότητα στην απόπτωση, η οποία οφείλεται στην απώλεια της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων εξαιτίας της έλλειψης του οξυγόνου.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στη μεταβολική προσαρμογή των κυττάρων Huh7 στην υποξία, ελέγχθηκε ο μεταβολισμός των λιπιδίων. Για το σκοπό αυτό, ελέγχθηκε η μεταγραφή του γονιδίου της λιπίνης 1, η οποία, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου Βιοχημείας (122, 236), ενεργοποιείται μεταγραφικά από τον HIF-1, και η επαγωγή της στην υποξία παίζει καθοριστικό ρόλο στη σύνθεση των τριγλυκεριδίων, τα οποία συσσωρεύονται σε λιποσταγονίδια (236), μια διεργασία πολύ σημαντική για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στις συνθήκες αυτές. Όπως παρατηρήθηκε προηγουμένως για τα άλλα γονίδια-στόχους του HIF-1 (*P4HA1* και *NDRG1*), η επαγωγή του γονιδίου *LPIN1* αναστάλθηκε μετά από επίδραση των κυττάρων Huh7 με τις δραστικές μορφές του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG (wt, SE, IA), αλλά δεν επηρεάστηκε από

το κυτταροπλασματικό πεπτιδίο TAT-ETD SA-FLAG (Εικόνα 77Α). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να μειωθεί σημαντικά η συσσώρευση των λιποσταγονιδίων σε συνθήκες υποξίας παρουσία των πεπτιδίων αυτών (wt, SE, IA) (στα επίπεδα που παρατηρούνται στη νορμοξία). Παρόλα αυτά, καμία πεπτιδική μορφή δεν επηρέασε το σχηματισμό των λιποσταγονιδίων στη νορμοξία (Εικόνα 77Β, Γ).

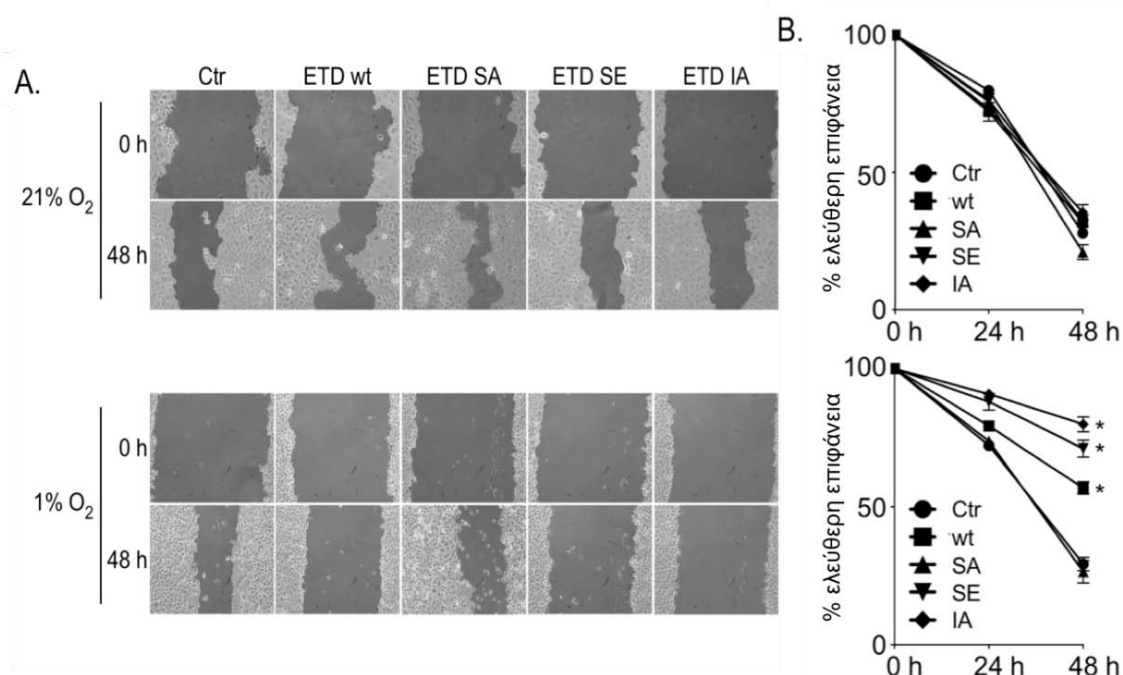


Εικόνα 77: Τα κυτταροδιαεισδυτικά πεπτιδία TAT-ETD-FLAG (wt, SE, IA) που αναστέλλουν τον HIF-1, μειώνουν την επαγωγή της λιπίνης 1 και το σχηματισμό λιποσταγονιδίων στην υποξία. (Α) Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *LPIN1* με qRT-PCR, σε κύτταρα Huh7 που επωάστηκαν για 16 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και υποξίας (1% O₂), 1 ώρα μετά από τη χορήγηση 3 μg/ml των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως φορές επαγωγής από την υποξία σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη νορμοξίας, και αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων και σύνολο 6 τιμών. (Β) Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα Huh7 που κατεργάστηκαν όπως στο (Α) και επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία και υποξία. Μικροσκοπική παρατήρηση των διαφόρων πεπτιδικών μορφών με αντίσωμα ενάντια στον επίτοπο FLAG και των λιποσταγονιδίων μετά από χρώση με Nile Red. Η κλίμακα έχει οριστεί στα 10 μΜ. (Γ) Ποσοτική ανάλυση της έντασης φθορισμού του Nile Red σε 50 κύτταρα από τις φωτογραφίες ανοσοφθορισμού που παρουσιάζονται στο (Β), και οι οποίες προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα. (-/+ s.e.m., *: P<0.05, **: P<0.01, n.s.: μη σημαντική διαφορά, σε σχέση με το κοντρόλ της υποξίας).

Γ.2.6 Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων Huh7

Μια άλλη πτυχή της βιολογίας των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να μεταναστεύουν, ιδιότητα που συνήθως επάγεται σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου και επιτρέπει τη δημιουργία νέων μεταστατικών εστιών.

Όπως δείχθηκε προηγουμένως, τα πυρηνικά πεπτίδια TAT-ETD-FLAG (wt, SE, IA) αναστέλλουν τη μεταγραφή του ειδικού γονιδίου-στόχου του HIF-1, *P4HA1*, σε συνθήκες υποξίας. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για το ένζυμο προλυλ-υδροξυλάση του κολλαγόνου, το οποίο εμπλέκεται στη διαδικασία της μετανάστευσης. Έτσι, ελέγχθηκε η επίδραση των πεπτιδίων στη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων Huh7, εφαρμόζοντας μια δοκιμασία επούλωσης τραύματος σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, υπό την επίδραση των κυτταροδιαισδυτικών πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG για 0, 24 και 48 ώρες (Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος B.2.21). Παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες νορμοξίας, κανένα από τα πεπτίδια δεν επηρέασε τη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων στην ελεύθερη επιφάνεια (Εικόνα 78Α, Β πάνω). Αντίθετα, σε συνθήκες υποξίας, τα δραστικά πεπτίδια (κυρίως οι μορφές SE και IA) μείωσαν σημαντικά την απόσταση που κάλυψαν τα κύτταρα (Εικόνα 78Α, Β κάτω), υποδεικνύοντας μια ισχυρή αρνητική ρύθμιση της μεταναστευτικής ικανότητας των υποξικών κυττάρων Huh7, από τις μορφές του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG που αναστέλλουν τον HIF-1.

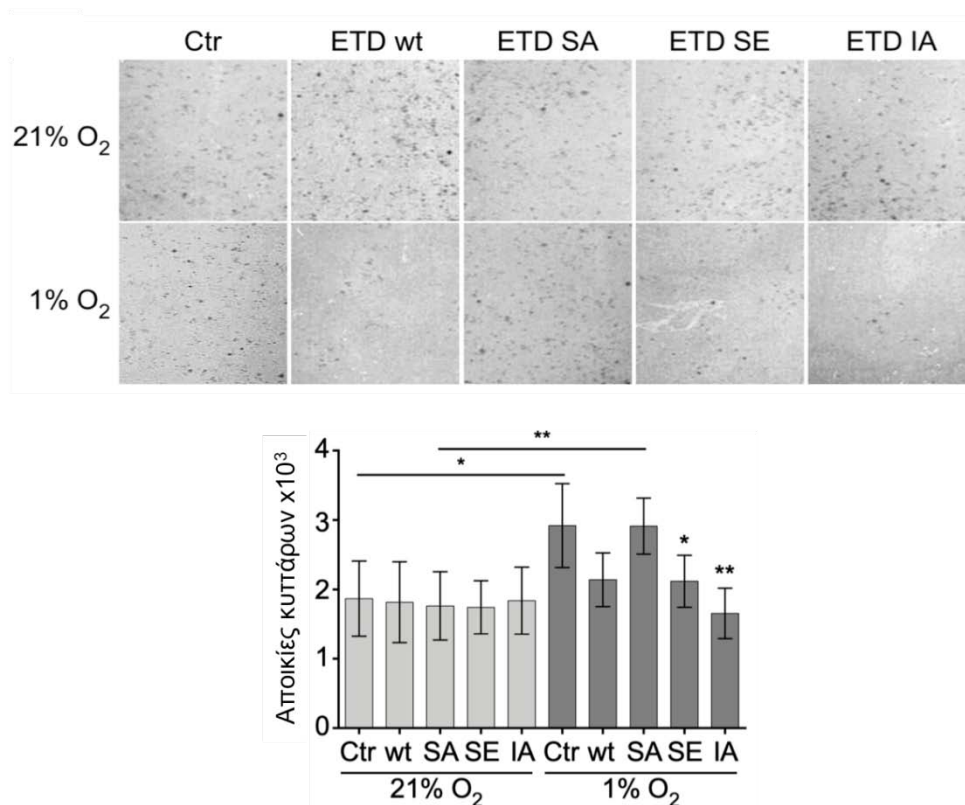


Εικόνα 78: Τα δραστικά πεπτίδια TAT-ETD-FLAG (wt, SE, IA) αναστέλλουν τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων Huh7 στην υποξία. Δοκιμασία επούλωσης τραύματος σε κύτταρα Huh7, στα οποία

έγινε επίδραση με 3 $\mu\text{g/ml}$ από την εκάστοτε πεπτιδική μορφή, και 1 ώρα μετά επωάστηκαν σε νορμοξία (21% O_2) και υποξία (1% O_2) για 0-48 ώρες. (Α) Οι εικόνες παρουσιάζουν τη μετακίνηση των κυττάρων στην ελεύθερη περιοχή στις χρονικές στιγμές που αναγράφονται για τη συνθήκη της νορμοξίας (πάνω) και της υποξίας (κάτω). (Β) Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την % μείωση της αρχικής ελεύθερης επιφάνειας στις χρονικές στιγμές που φαίνονται. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο από 10 διαφορετικές μετρήσεις σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. (-/+ s.e.m., *: $P < 0.05$)

Γ.2.7 Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων Huh7 να σχηματίζουν αποικίες

Σημαντική βιολογική λειτουργία των καρκινικών κυττάρων αποτελεί επίσης η ικανότητά τους να σχηματίζουν αποικίες, ξεκινώντας από ένα μοναδικό κύτταρο. Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των πεπτιδικών αναστολέων TAT-ETD-FLAG στην ιδιότητα αυτή, τα κύτταρα Huh7 υποβλήθηκαν σε μια δοκιμασία κλωνογονικότητας (Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος Β.2.22). Ύστερα από την επίδραση με το φωσφομιμητικό πεπτίδιο ή με το πεπτίδιο που είναι αποκλειστικά πυρηνικό λόγω του κατεστραμμένου NES (SE, IA), η ικανότητα σχηματισμού αποικιών που επάγεται από την υποξία, αναστάλθηκε σημαντικά, καθώς ο αριθμός και το μέγεθος των αποικιών που σχηματίστηκαν, ήταν μειωμένα (σχεδόν στα επίπεδα που παρατηρούνται στη νορμοξία) σε σχέση με τις συνθήκες απουσίας πεπτιδίου ή παρουσίας του κυτταροπλασματικού πεπτιδίου TAT-ETD SA-FLAG. Η μορφή TAT-ETD IA-FLAG εμφάνισε την πιο ισχυρή και στατιστικά σημαντική επίδραση στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων Huh7.



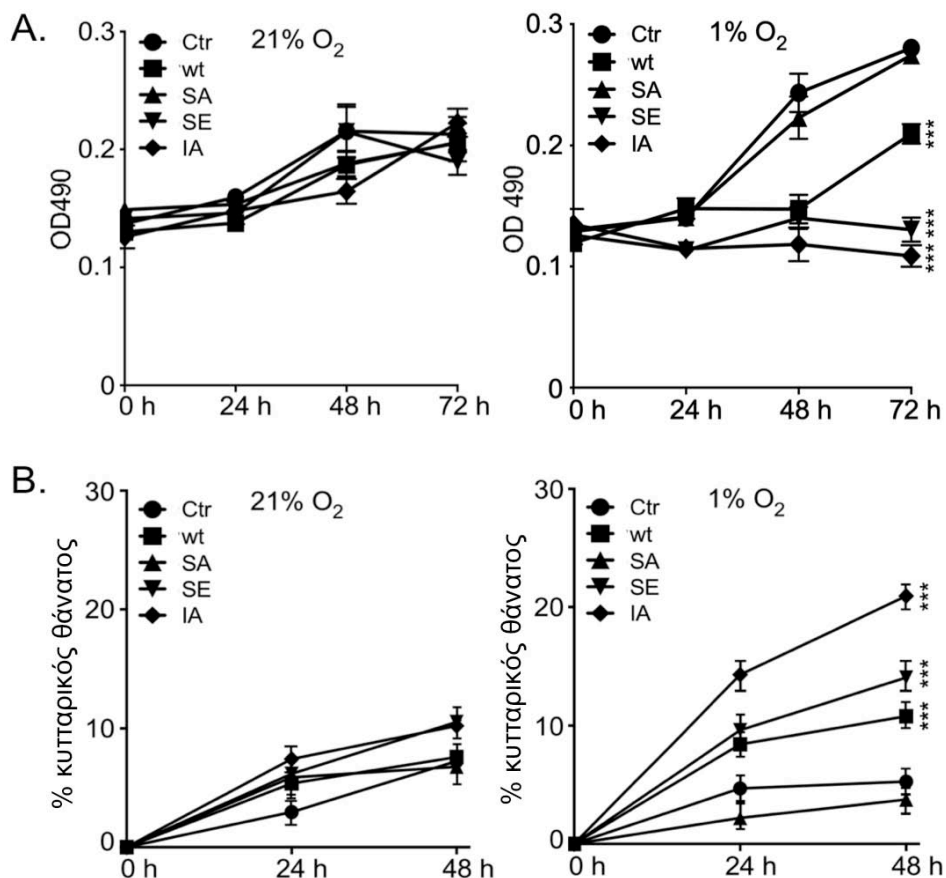
Εικόνα 79: Η επίδραση με τα δραστικά κυτταροδιασυνδυκτικά πεπτιδία TAT-ETD-FLAG (SE, IA) αναστέλλει την ικανότητα των κυττάρων Huh7 να σχηματίζουν αποικίες στην υποξία. Αντιπροσωπευτικές εικόνες (πάνω) των αποικιών που σχηματίστηκαν από κύτταρα Huh7 τα οποία επωάστηκαν για 96 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και υποξίας (1% O₂), παρουσία 3 μg/ml από την εκάστοτε μορφή του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG. Το διάγραμμα (κάτω) δείχνει τον αριθμό των αποικιών που σχηματίστηκαν σε κάθε συνθήκη και μετρήθηκαν με το λογισμικό ImageJ στις φωτογραφίες που προέκυψαν από 5 ανεξάρτητα πειράματα. (-/+ s.e.m., *: P<0.05, **: P<0.01)

Γ.2.8 Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στον πολλαπλασιασμό και το θάνατο των καρκινικών κυττάρων Huh7

Στη συνέχεια, εξετάστηκε ο τρόπος με τον οποίο η αναστολή των παραπάνω βιολογικών λειτουργιών, επηρεάζει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Η απώλεια της ικανότητας των κυττάρων Huh7 να διαιρούνται και να σχηματίζουν αποικίες, μετά από επίδραση με τους πεπτιδικούς αναστολείς TAT-ETD wt/SE/IA-FLAG, υπέδειξε ότι ίσως επηρεάζεται ο πολλαπλασιασμός τους, εξαιτίας του χαμηλού ρυθμού του κυτταρικού κύκλου.

Πράγματι, διαπιστώθηκε ό τι οι μορφές του πεπτιδίου TAT-ETD-FLAG που αναστέλλουν τον HIF-1, εκτός της TAT-ETD SA-FLAG μορφής, προκάλεσαν τη μείωση του αριθμού των κυττάρων, αποκλειστικά σε συνθήκες υποξίας σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς. Αντίθετα, στη νορμοξία που ο HIF-1 εκλείπει, καμία μορφή των

κυτταροδιαδυσδυτικών πεπτιδίων δεν επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 80Α).



Εικόνα 80: Τα κυτταροδιαδυσδυτικά πεπτιδία TAT-ETD-FLAG (wt, SE, IA) που αναστέλλουν τη δράση του HIF-1 μειώνουν τον πολλαπλασιασμό και επάγουν τον θάνατο των κυττάρων Huh7 στην υποξία. Μέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων εκφρασμένη σε οπτική απορρόφηση (Α) και του θανάτου σε ποσοστό % (Β) των κυττάρων Huh7 που έχουν κατεργαστεί με 3 µg/ml από την εκάστοτε πεπτιδική μορφή και επώστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και υποξία (1% O₂) από 0-72 ώρες. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και σύνολο 9 τιμών. (-/+ s.e.m., ***: P<0.001)

Ο μειωμένος αυτός αριθμός κυττάρων, φάνηκε να οφείλεται σε σημαντική αύξηση του κυτταρικού θανάτου, μετά από κατεργασία με τις δραστικές μορφές TAT-ETD wt/SE/IA-FLAG, αλλά όχι με την SA μορφή, μόνο στην υποξία (Εικόνα 80B). Η αύξηση του κυτταρικού θανάτου στην υποξία πιθανόν να οφείλεται στην αναστολή των βιολογικών λειτουργιών που εξετάστηκαν προηγουμένως, όπως η μείωση της μεταβολικής προσαρμογής που είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων στις συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου.

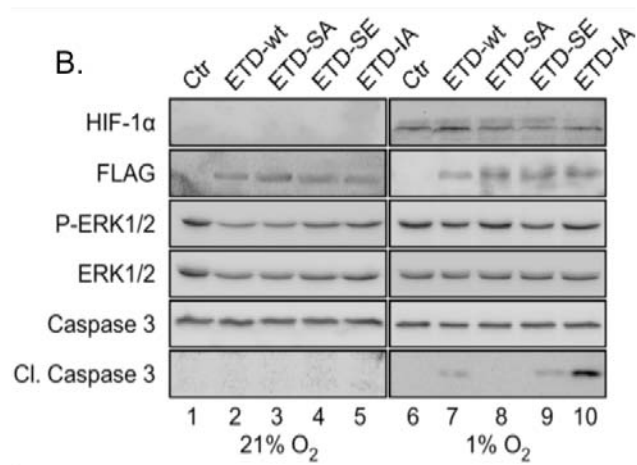
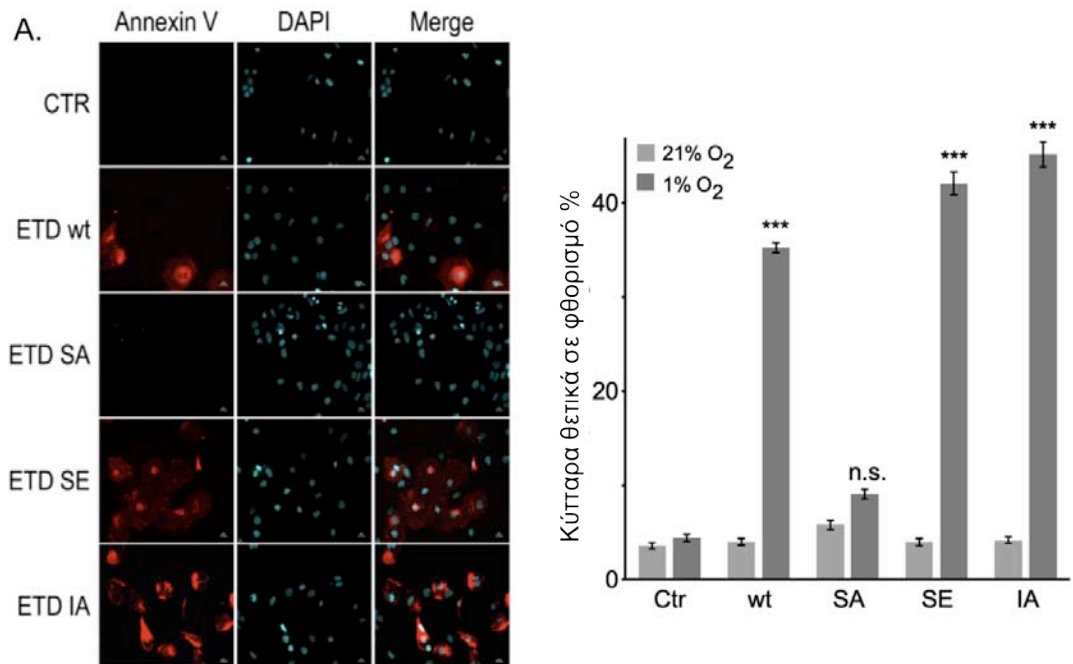
Γ.2.9 Έλεγχος της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG στην ενεργοποίηση της απόπτωσης

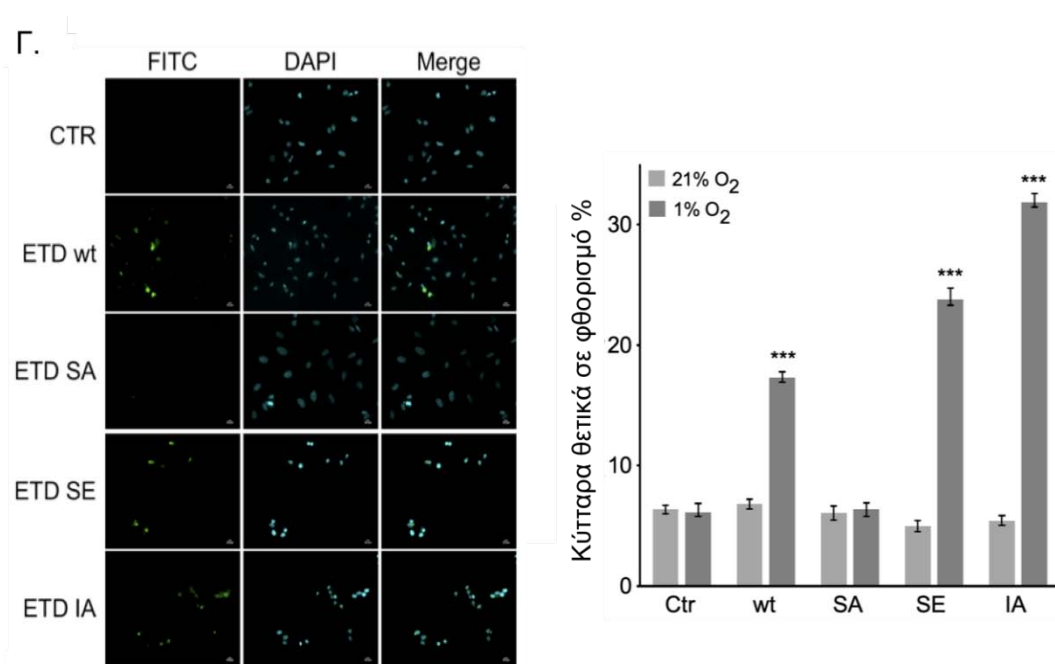
Προκειμένου να διαλευκανθεί ο μοριακός μηχανισμός που διαμεσολαβεί το θάνατο των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας που επάγεται από τα πεπτίδια TAT-ETD-FLAG, ελέγχθηκε το μονοπάτι της απόπτωσης στα διάφορα στάδια και βιοχημικά χαρακτηριστικά του (Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφοι Β.2.25, Β.2.26, Β.2.27). Το πρώτο και πιο πρώιμο στάδιο περιλαμβάνει την απώλεια της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας. Για να μελετηθεί η μετακίνηση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, εφαρμόστηκε μια μέθοδος που χρησιμοποιεί την Αννεξίνη 5, η οποία αλληλεπιδρά ισχυρά και ειδικά με τα κατάλοιπα φωσφατιδυλοσερίνης που εκτίθενται προς τον εξωκυττάριο χώρο στα αποπτωτικά κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν σε υποξία παρουσία των δραστικών πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG (wt, SE, IA) εμφάνισαν αυξημένη αναδιοργάνωση της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης. Η επίδραση με τις πεπτιδικές αυτές μορφές, προκάλεσε την ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης σε μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων, σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς ή την επίδραση με το πεπτίδιο TAT-ETD SA-FLAG (Εικόνα 81Α).

Ελέγχοντας για περισσότερους δείκτες κυτταρικής απόπτωσης, διερευνήθηκε η ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης 3, με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος ενάντια στην ενεργοποιημένη μορφή της. Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας παρουσία των πεπτιδίων που αναστέλλουν τον HIF-1, ανιχνεύθηκε η ενεργοποιημένη μορφή της κασπάσης 3, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κύτταρα βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο της απόπτωσης. Αντίθετα, σε κύτταρα που επώαστηκαν με την TAT-ETD SA-FLAG μορφή στην υποξία ή σε συνθήκες νορμοξίας κανένα από τα κυτταροδιεισδυτικά πεπτίδια δεν προκάλεσε τη επαγωγή της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα Huh7 (Εικόνα 81Β). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι καμία πεπτιδική μορφή δεν επηρέασε τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERK1/2 σε νορμοξία ή υποξία, γεγονός που υποστηρίζει τη δράση των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG ως ειδικών αναστολέων του HIF-1α και όχι παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση των ERK1/2.

Τελικό στάδιο της απόπτωσης αποτελεί η θραύση του DNA, η οποία εξετάστηκε με τη μέθοδο TUNEL, που στηρίζεται στην εισαγωγή σημασμένων dNTPs στα ελεύθερα 3'-OH άκρα που έχουν σχηματιστεί από τη θραύση του DNA στα αποπτωτικά κύτταρα. Παρατηρήθηκε, ότι ο αριθμός των κυττάρων Huh7 που βρίσκονται σε αυτό το προχωρημένο στάδιο της απόπτωσης είναι αυξημένος, μετά από επίδραση με τις δραστικές μορφές TAT-

ETD wt/SE/IA-FLAG αποκλειστικά σε συνθήκες υποξίας, ενώ η μορφή SA λειτουργήσε πάλι σαν αρνητικό κοντρόλ (Εικόνα 81Γ).





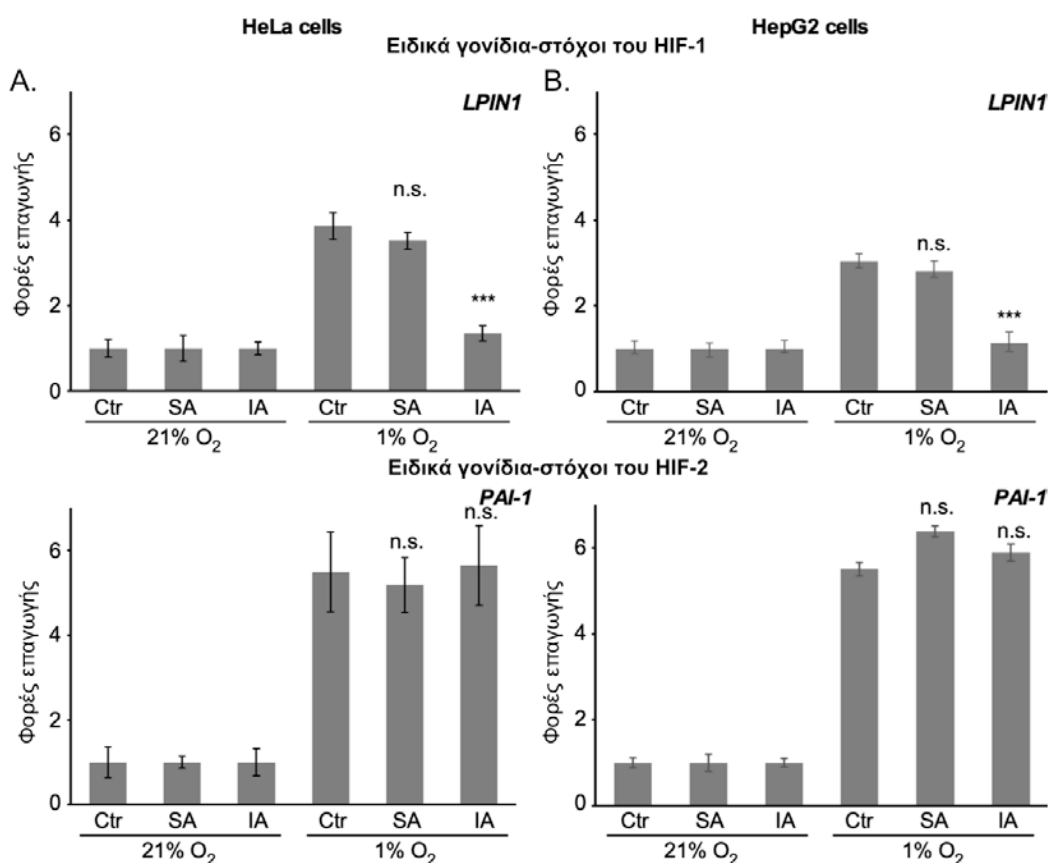
Εικόνα 81: Τα κυτταροδιαδυσδυτικά πεπτίδια TAT-ETD-FLAG (wt, SE, IA) που δρουν ως ειδικοί αναστολείς του HIF-1 επάγουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης σε συνθήκες υποξίας. (Α) Αριστερά: Μικροσκοπία φθορισμού για την Annexin V (κόκκινο κανάλι), σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) για 24 ώρες παρουσία 3 µg/ml της εκάστοτε πεπτιδικής μορφής. Το DAPI χρησιμοποιήθηκε για την επισήμανση του πυρήνα των κυττάρων. Η κλίμακα ορίστηκε στα 10 µM. Δεξιά: Το διάγραμμα αναπαριστά το ποσοστό % των αποπτωτικών κυττάρων (θετικών στο φθορισμό με Annexin V) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν (230-250) για κάθε συνθήκη σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. (Β) Ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Huh7 που κατεργάστηκαν όπως στο (Α) και επώαστηκαν για 48 ώρες σε νορμοξία (21% O₂) και υποξία (1% O₂), αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ανίχνευση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αντισώματα. (Γ) Αριστερά: Μικροσκοπία φθορισμού σε κύτταρα Huh7 που κατεργάστηκαν όπως στο (Β) εφαρμόζοντας τη μέθοδο TUNEL (πράσινο κανάλι) για παρατήρηση της θραύσης του DNA. Η κλίμακα ορίστηκε στα 10 µM. Αριστερά: Το διάγραμμα αναπαριστά το ποσοστό % των αποπτωτικών κυττάρων (θετικών στο φθορισμό με TUNEL) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν (230-250) για κάθε συνθήκη σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. (-/+ s.e.m., ***: P<0.001)

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κυτταροδιαδυσδυτικά πεπτίδια TAT-ETD-FLAG που στοχεύουν τη ρύθμιση του HIF-1α από τις ERK1/2, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων Huh7 αποκλειστικά σε συνθήκες υποξίας, χωρίς να εμφανίζουν μη ειδικές επιδράσεις όταν χορηγούνται σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε συνθήκες νορμοξίας.

Γ.2.10 Έλεγχος της επίδρασης των πεπτιδίων TAT-ETD(SA/IA)-FLAG στον κυτταρικό θάνατο και την ενεργοποίηση της απόπτωσης σε κύτταρα HeLa και HepG2

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των πεπτιδίων TAT-ETD-FLAG και σε άλλες κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2 και καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας HeLa, τα οποία κατεργάστηκαν με 3 $\mu\text{g/ml}$ της πιο δραστηρικής πεπτιδικής μορφής TAT-ETD IA-FLAG και της μορφής που λειτουργεί σαν αρνητικό κοντρόλ, TAT-ETD SA-FLAG.

Η επίδραση με τη δραστηρική ETD IA μορφή φάνηκε να αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα HepG2 και HeLa, καθώς μείωσε τη μεταγραφή του ειδικού γονιδίου στόχου του *LPIN1*, σε συνθήκες υποξίας. Αντίθετα, δεν επηρέασε καθόλου τα επίπεδα mRNA του ειδικού γονιδίου στόχου του HIF-2, *PAI-1* (Εικόνα 82).

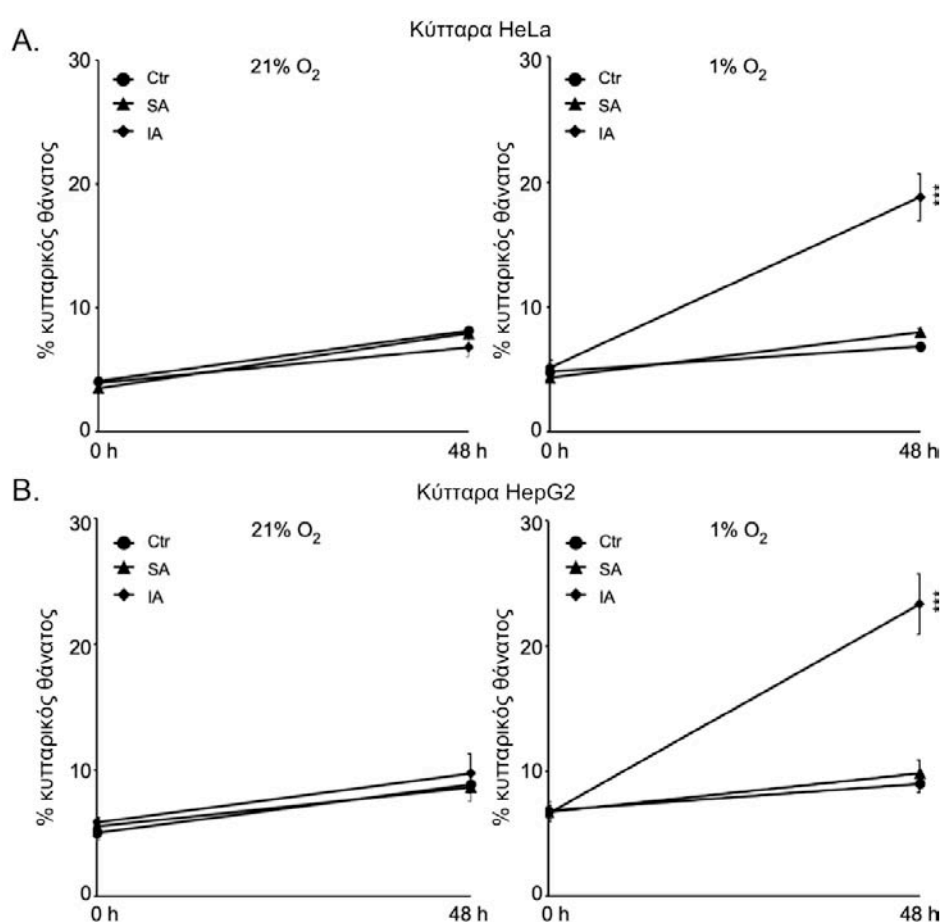


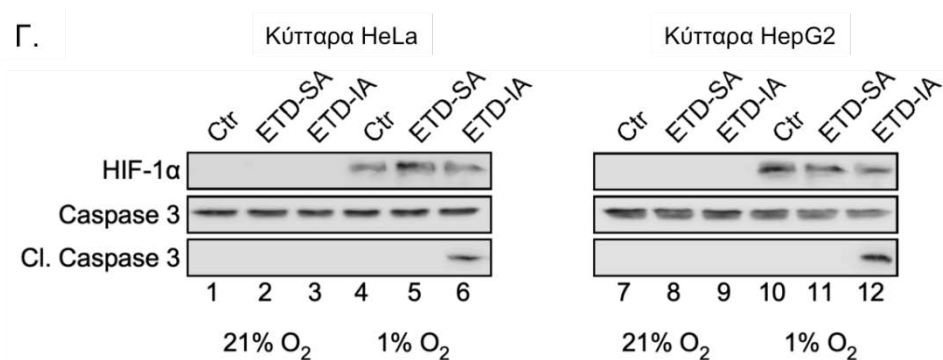
Εικόνα 82: Το κυτταροδιασυνδεδεμένο πεπτίδιο TAT-ETD IA-FLAG αναστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του HIF-1 συνθήκες υποξίας σε κύτταρα HeLa και HepG2. Μέτρηση των επιπέδων mRNA με qRT-PCR, του ειδικού γονιδίου-στόχου του HIF-1, *LPIN1* και του ειδικού γονιδίου-στόχου του HIF-2, *PAI-1*, σε κύτταρα (A) HeLa και (B) HepG2, στα οποία έγινε επίδραση με 3 $\mu\text{g/ml}$ των πεπτιδικών μορφών TAT-ETD-FLAG (SA/IA) και επωάστηκαν για 16h σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και υποξίας (1% O₂). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως φορές επαγωγής της υποξίας σε σχέση με τη νορμοξία και αντιπροσωπεύουν το

μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και σύνολο 6 τιμών. (-/+ s.e.m., ***: $P < 0.001$, n.s.: μη σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με τη συνθήκη κοντρόλ της υποξίας)

Επίσης, παρουσία της ETD IA μορφής, παρατηρήθηκε επαγωγή του κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα HeLa (Εικόνα 83Α) και HepG2 (Εικόνα 83Β) που επωάστηκαν σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον, η ανασταλτική ικανότητα του πεπτιδίου TAT-ETD IA-FLAG, επιβεβαιώθηκε και από την ενεργοποίηση της αποπτωτικής κασπάσης 3 στα κύτταρα αυτά (Εικόνα 83Γ).

Επομένως, τα κυτταροδιαδυσδυτικά πεπτίδια TAT-ETD-FLAG μπορούν να αποτελούν ειδικούς και ισχυρούς αναστολείς του HIF-1 σε διάφορες καρκινικές σειρές.





Εικόνα 83: Το κυτταροδιεισδυτικό πεπτίδιο TAT-ETD IA-FLAG επάγει τον κυτταρικό θάνατο και την ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα HeLa και HepG2. Μέτρηση του θανάτου σε ποσοστό % των κυττάρων HeLa (Α) και HepG2 (Β) που έχουν κατεργαστεί με 3 μg/ml από την εκάστοτε πεπτιδική μορφή και επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και υποξία (1% O₂) από 0-48 ώρες. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων και σύνολο 8 τιμών (-/+ s.e.m., ***: P<0.001). (Β) Ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa (αριστερά) και HepG2 (δεξιά), που κατεργάστηκαν με τις πεπτιδικές μορφές TAT-ETD-FLAG που αναγράφονται, επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (διαδρομές 1-3 και 1-9) και υποξίας (διαδρομές 4-6 και 10-12) για 48 ώρες και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western και τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων ενάντια στον HIF-1α, στην κασπάση 3 και την ενεργοποιημένη κασπάση 3.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έκθεση των κυττάρων σε μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου αποτελεί μία κατάσταση που χαρακτηρίζει μια σειρά από σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, η ισχαιμία και οι μεταβολικές νόσοι. Η απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας επιτυγχάνεται μέσω μιας σειράς προσαρμοστικών αλλαγών, οι οποίες περιλαμβάνουν την επαγωγή της έκφρασης ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, που διαμεσολαβείται από τους επαγόμενους από την υποξία μεταγραφικούς παράγοντες, HIF (289). Η δράση των HIF ελέγχεται πρωταρχικά από τα επίπεδα του οξυγόνου, αλλά ρυθμίζεται με μεγαλύτερη ακρίβεια από μηχανισμούς που δεν εξαρτώνται από το οξυγόνο, στους οποίους περιλαμβάνονται μεταφραστικές τροποποιήσεις, με καλύτερα μελετημένη τη φωσφορυλίωση (63), (55). Οι HIF-α φωσφορυλιώνονται σε πολλαπλές θέσεις από διάφορες κινάσες, οι οποίες τους ρυθμίζουν είτε θετικά ή αρνητικά σε επίπεδο σταθερότητας, αλληλεπίδρασης με τον ARNT και με συμπαράγοντες της μεταγραφής. Για παράδειγμα, όσον αφορά τον HIF-1 έχει βρεθεί ότι οι ERK1/2 στοχεύουν τον HIF-1α και επάγουν άμεσα τη δράση του στην υποξία, προκαλώντας τη συσσώρευσή του στον πυρήνα (127), (34). Έτσι, ο κύκλος φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης είναι ένας αντιστρεπτός μηχανισμός που επηρεάζει σημαντικά τις βιολογικές λειτουργίες των κυττάρων. Παρόλα αυτά, η γνώση γύρω από το ρόλο των φωσφατάσων στη ρύθμιση των HIF παραμένει ελλιπής μέχρι σήμερα.

Σκοπός της διατριβής ήταν η μελέτη του ρόλου της φωσφορυλίωσης των HIF και ειδικότερα της ρύθμισης του HIF-1 από τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2, στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας και στην προώθηση της ογκογένεσης. Αυτό πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους, Α) αναζητώντας φωσφατάσες που επηρεάζουν τη δράση των HIF και Β) κατασκευάζοντας πεπτίδια που αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2.

ΜΕΡΟΣ Α'

Η ταυτοποίηση των φωσφατάσων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της δράσης των HIF πραγματοποιήθηκε μέσω μίας δοκιμασίας διαλογής (screen), η οποία βασίστηκε στην αποσιώπηση της έκφρασης των καταλυτικών υπομονάδων 25 φωσφατάσων σερίνης/θρεονίνης (PSP) και διπλής εξειδίκευσης (DUSP), με τη χρήση μίας βιβλιοθήκης siRNA όλων των χαρακτηρισμένων ανθρώπινων φωσφατάσων. Από τη δοκιμασία διαλογής προέκυψε ότι κάποιες από τις φωσφατάσες που εξετάστηκαν επηρεάζουν τη δράση των HIF

θετικά, κάποιες ασκούν αρνητική ρύθμιση, ενώ κάποιες άλλες δε μεταβάλλουν καθόλου τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF σε συνθήκες υποξίας.

Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε εκτενώς ο ρόλος δύο φωσφατασών που ανήκουν στην κατηγορία των φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης, καθώς οι HIF-α φωσφορυλιώνονται κυρίως σε κατάλοιπα σερίνης. Η πρώτη είναι η ισομορφή Α της καταλυτικής υπομονάδας της καλσινευρίνης (PPP3CA), η αποσιώπηση της οποίας παρουσίασε την ισχυρότερη θετική επίδραση στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF στην υποξία (Αποτελέσματα, παράγραφος Γ.1.1, εικόνα 40 και πίνακας 8). Οι άλλες δύο ισομορφές της φωσφατάσης αυτής (PPP3CB, PPP3CC), δε φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση των HIF, καθώς η αποσιώπησή τους στα πλαίσια της δοκιμασίας διαλογής δεν προκάλεσε ιδιαίτερη μεταβολή στη δράση των HIF. Αντίθετη επίδραση φάνηκε να έχει η αποσιώπηση της φωσφατάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού 1 (PDP1), η οποία ανέστειλε τη δράση των HIF σε συνθήκες υποξίας (Αποτελέσματα, παράγραφος Γ.1.1, εικόνα 40 και πίνακας 8). Η δεύτερη ισομορφή της φωσφατάσης (PDP2), που παρουσιάζει ιστοειδικότητα, δεν επηρέασε σημαντικά την εξαρτώμενη από τα HRE μεταγραφή. Οι δύο αυτές φωσφατάσες επιλέχθηκαν αφενός γιατί εμφάνισαν την ισχυρότερη επίδραση στην ενεργότητα των HIF μεταξύ των υπολοίπων φωσφατασών της κατηγορίας σερίνης/θρεονίνης, και αφετέρου, γιατί σχετίζονται με το μονοπάτι της υποξίας. Προηγούμενες μελέτες, έχουν συσχετίσει έμμεσα και αντιφατικά μεταξύ τους, την καλσινευρίνη με τον HIF-1α (δες παρακάτω). Επομένως θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί ο ρόλος της στη ρύθμιση των HIF σε συνθήκες υποξίας. Από την άλλη, η PDP1 έχειδειχθεί ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού, ελέγχοντας τη λειτουργία του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDC). Η έλλειψη οξυγόνου οδηγεί σε επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού και αναστολή της λειτουργίας του PDC. Σκοπός λοιπόν, ήταν η διερεύνηση του ρόλου της PDP1 στη ρύθμιση των HIF και του μεταβολισμού σε συνθήκες υποξίας. Σύμφωνα με την αρχική διαλογή από τη βιβλιοθήκη των siRNA, μεταξύ των φωσφατασών που επηρεάζουν τους HIF φάνηκε να περιλαμβάνονται και πολλά μέλη της οικογένειας των DUSP (φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης) οι οποίες, όμως, δε μελετήθηκαν περαιτέρω στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, καθώς είναι γνωστό ότι εμπλέκονται κυρίως στη ρύθμιση της δράσης των ERK1/2 και πιθανόν επηρεάζουν έμμεσα τη φωσφορυλίωση του HIF-1 (139, 140, 148).

Ο ρόλος της PPP3CA στη ρύθμιση των HIF: Η PPP3CA είναι μια φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης και η δράση της ρυθμίζεται από τα επίπεδα του ασβεστίου. Φυσιολογικά αποτελείται από μια καταλυτική (CnA) και μια ρυθμιστική υπομονάδα (CnB, για την οποία έχουν χαρακτηριστεί δύο ισομορφές, PPP3R1 και PPP3R2). Είναι μια πολυλειτουργική

φωσφατάση και διαθέτει ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων. Έχειδειχθεί ότι εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, με πιο καλά μελετημένη την επαγωγή της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων, μέσω της άμεσης αποφωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα NFAT (129, 136).

Σε πειράματα που ακολούθησαν την παραπάνω δοκιμασία, πιστοποιήθηκε, με τη χρήση διαφορετικού siRNA, ότι η αποσιώπηση της καλσινευρίνης επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF σε συνθήκες υποξίας. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν μετά από υπερέκφραση της φωσφατάσης, που παρατηρήθηκε ότι η καλσινευρίνη μειώνει τη δράση των HIF, υποστηρίζοντας το ρόλο της ως πιθανό αναστολέα των HIF στην υποξία. Πειράματα υπερέκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών της PPP3CA (συνεχώς ενεργοποιημένη και καταλυτικά ανενεργή μορφή) διευκρίνισαν ότι η καταλυτική δράση της φωσφατάσης είναι απαραίτητη για την αναστολή των HIF. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν επίσης εφαρμόζοντας και μια διαφορετική προσέγγιση, η οποία δεν περιελάμβανε την υπερέκφραση της φωσφατάσης, αλλά την πλήρη ενεργοποίηση της ενζυμικής δράσης της ενδογενούς PPP3CA με τη χρήση της ιονομυκίνης, ενός ιονοφόρου που επάγει την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του Ca^{2+} . Η επίδραση με ιονομυκίνη οδήγησε σε αναστολή της δράσης των HIF και σε μείωση της μεταγραφής ειδικών γονιδίων-στόχων τόσο του HIF-1 όσο και του HIF-2, σε συνθήκες υποξίας.

Έτσι, στην παρούσα μελέτη διευκρινίστηκε ότι η φωσφατάση PPP3CA διαθέτει ρόλο αρνητικού ρυθμιστή της ενεργότητας των HIF. Στη βιβλιογραφία έχουν αποδοθεί πολλοί διακριτοί ρόλοι στην PPP3CA ανάλογα με τον ιστό και τα όργανα που εξετάστηκε (290), ενώ, υπάρχουν λίγες αναφορές που τη συσχετίζουν με το μονοπάτι της υποξίας. Ο Liu και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η υπερέκφραση της PPP3CA σε κύτταρα HEK293T ή η κατεργασία τους με ιονομυκίνη, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων και της δράσης του HIF-1α (137). Ανέφεραν, επίσης, ότι αυτό οφείλεται στην αποφωσφορυλίωση της RACK1 από την PPP3CA και την αναστολή του διμερισμού της, γεγονός που οδηγεί σε σταθεροποίηση του HIF-1α, καθώς όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή, η RACK1 διαμεσολαβεί στην ανεξάρτητη από το οξυγόνο και τον pVHL ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του HIF-1α. Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των HIF-1α και HIF-2α σε καμία από τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, δηλαδή μετά από αποσιώπηση ή υπερέκφραση της PPP3CA, ή μετά από επίδραση με ιονομυκίνη, σε κύτταρα HeLa. Όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της φωσφατάσης ήταν αντιστρόφως ανάλογη με τη δράση των HIF ή την επαγόμενη από τους HIF γονιδιακή έκφραση. Αν και τα αποτελέσματα αυτά

μοιάζουν αντιφατικά σε σχέση με τη μελέτη των Liu και συνεργατών, μπορούν να εξηγηθούν από την ειδικότητα που εμφανίζει ο μηχανισμός της εξαρτώμενης από τη RACK1 αποικοδόμησης του HIF-1α ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, ή από την ιστοειδική έκφραση της ρυθμιστικής υπομονάδας της καλσινευρίνης και προτείνουν ότι η PPP3CA μπορεί να έχει διαφορετική επίδραση στη δράση των HIF ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου ή του ιστού.

Ο Eschricht και οι συνεργάτες του υποστήριξαν ότι σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την PPP3CA, τα επίπεδα mRNA του HIF-1α βρέθηκαν να είναι αυξημένα μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την Hsp90 (291). Μία διαφορετική ομάδα, συμφωνώντας με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, έδειξε ότι η αποσιώπηση της PPP3CA προκάλεσε την επαγωγή του εξαρτώμενου από τον VEGF πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων εμβρυοπλακουντικής αρτηρίας (292). Μια πρόσφατη μελέτη πρότεινε ότι κατά το μιτοχονδριακό στρες επάγεται η ενεργοποίηση της PPP3CA εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων Ca^{2+} . Η PPP3CA διαμεσολαβεί την αύξηση της έκφρασης του p53, ο οποίος αλληλεπιδρώντας με τον HIF-1α οδηγεί στην ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του τελευταίου (293). Τέλος, υπάρχει μια βιβλιογραφική αναφορά που συσχετίζει έμμεσα τη ρυθμιστική υπομονάδα της καλσινευρίνης (CnB) με αναστολή της δράσης του HIF-1α (294). Συμπερασματικά, υπάρχουν αρκετά αντικρουόμενα στοιχεία στη βιβλιογραφία μέχρι στιγμής όσον αφορά το ρόλο της PPP3CA στην υποξία και στη ρύθμιση των HIF, γεγονός που δείχνει πως αρκετά σημεία του μηχανισμού παραμένουν αδιευκρίνιστα.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η επίδραση με ιονομυκίνη ανέστειλε τη δράση των HIF και τη μεταγραφή γνωστών γονιδίων-στόχων της υποξίας. Το φαινόμενο αυτό υποδεικνύει ένα σημαντικό ρόλο του Ca^{2+} στη ρύθμιση του μονοπατιού της υποξίας και των HIF. Παράλληλα, η συνδυασμένη επίδραση με υπερέκφραση της αγρίου τύπου PPP3CA και κατεργασία με ιονομυκίνη, μείωσε περαιτέρω τη δράση των HIF. Έχει δειχθεί βιβλιογραφικά ότι η ιονομυκίνη και το ασβέστιο, πέραν της ενεργοποίησης της PPP3CA, διαθέτουν πρόσθετους ρόλους σε συνθήκες υποξίας που μπορεί να επηρεάζουν τη δράση των HIF (61, 295). Ωστόσο, πειράματα αποσιώπησης της PPP3CA και ταυτόχρονης κατεργασίας με ιονομυκίνη, επιβεβαίωσαν ότι σε αυτή την περίπτωση η επίδραση της ιονομυκίνης στη ρύθμιση των HIF διαμεσολαβείται από την PPP3CA. Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν, η κατεργασία με ιονομυκίνη για 8 ώρες σε συνθήκες υποξίας, ανέστειλε τη δράση των HIF, αλλά δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων των HIF-1α και HIF-2α.

Παρότι δείχθηκε ξεκάθαρα ότι η PPP3CA ρυθμίζει αρνητικά τους HIF, δε διευκρινίστηκε πλήρως ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου ασκεί τη δράση της.

Δεδομένου ότι σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν (αποσιώπηση ή υπερέκφραση της PPP3CA) η έκφραση της οξυγόνο-εξαρτώμενης α-υπομονάδας δεν επηρεάστηκε, η επίδραση της PPP3CA θα πρέπει να εκδηλώνεται σε κάποιο μεταγενέστερο στάδιο από αυτό της επαγόμενης από την υποξία σταθεροποίησης των HIF-α. Αφού σταθεροποιηθούν, οι HIF-α εισάγονται στον πυρήνα όπου ετεροδιμερίζονται με τον ARNT προκειμένου να σχηματιστεί λειτουργικό σύμπλοκο. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας, η μετακίνηση των HIF-α μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος είναι μια διαδικασία που υπόκειται σε έλεγχο μέσω της απευθείας φωσφορυλίωσης, είτε από τις ERK1/2 στην περίπτωση του HIF-1α (34, 127), είτε από τη CK1δ στην περίπτωση του HIF-2α (130). Και στις δύο περιπτώσεις, η φωσφορυλίωση αυξάνει την πυρηνική συσσώρευση των HIF-α και κατ' επέκταση τη δράση των HIF. Έτσι, εφόσον η PPP3CA αναστέλλει τη δράση των HIF, θα μπορούσε να αποφωσφορυλιώνει τις θέσεις-στόχους των ERK1/2 και CK1δ. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε η μετατόπιση του HIF-1α στο κυτταρόπλασμα σε συνθήκες υποξίας μετά από υπερέκφραση της PPP3CA ή/και μετά από κατεργασία με ιονομυκίνη. Επομένως, η PPP3CA δεν φαίνεται να ρυθμίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α. Αυτό πιθανόν ισχύει και για την περίπτωση του HIF-2α (που λόγω μη κατάλληλου αντισώματος δεν ελέγχθηκε με ανοσοφθορισμό), εφόσον δεν παρατηρήθηκε εκλεκτική επίδραση της PPP3CA σε μία από τις δύο HIF-α ισομορφές, εκτός κι αν ο μηχανισμός ρύθμισης μέσω της PPP3CA διαφοροποιείται για τις δύο ισομορφές (γεγονός που δεν έχει καταστεί σαφές). Έτσι, αφού ο εντοπισμός του HIF-1α δε μεταβλήθηκε, εξετάστηκε η πιθανότητα η PPP3CA να αναστέλλει το διμερισμό του HIF-1α με τον ARNT. Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης που πραγματοποιήθηκαν απέκλεισαν το ενδεχόμενο αυτό, καθώς έδειξαν ότι ο ARNT συγκατακρημνίζεται μαζί με τον HIF-1α μετά από επίδραση με ιονομυκίνη το ίδιο καλά με τη συνθήκη αναφοράς της υποξίας.

Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης, δεν ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση του HIF-1α με την PPP3CA. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η PPP3CA δεν τροποποιεί άμεσα τον HIF-1α. Περισσότερο πιθανό είναι να ρυθμίζει έμμεσα τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, με τη στόχευση φωσφορυλιωμένων θέσεων άλλων παραγόντων που δρουν ως συνενεργοποιητές του HIF-1 (63).

Συγκεντρωτικά λοιπόν, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η PPP3CA αναστέλλει τη δράση των HIF μέσω ενός έμμεσου μηχανισμού, που δεν περιλαμβάνει την αποσταθεροποίηση των HIF-α, τον αποκλεισμό του HIF-1α από τον πυρήνα ή την παρεμπόδιση της σύνδεσής του με τον ARNT.

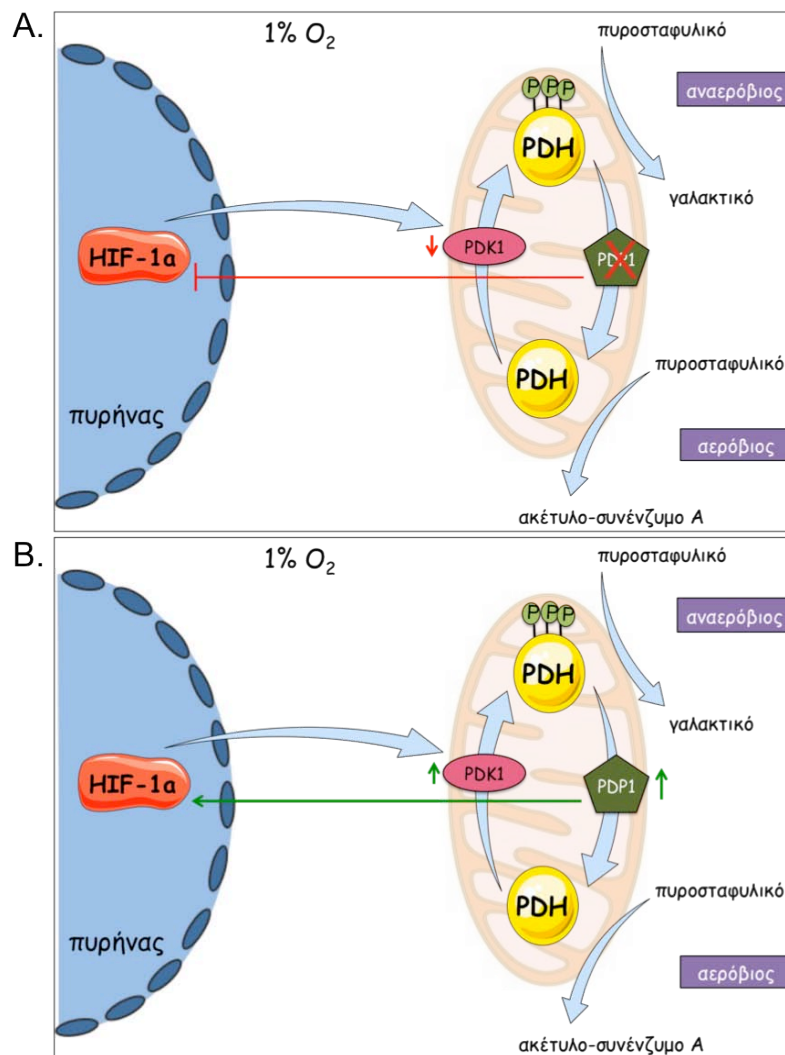
Μελλοντικά, η περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού ρύθμισης των HIF από την PPP3CA θα μπορούσε να εστιαστεί στον έλεγχο της εμπλοκής της φωσφατάσης στα στάδια που καθορίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF μέσα στον πυρήνα. Σε αυτά τα στάδια συμπεριλαμβάνεται η αλληλεπίδραση του HIF-1α με συμπαράγοντες της μεταγραφής και με πυρηνικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη δέσμευσή του στη χρωματίνη και το μηχανισμό της μεταγραφής. Για να ισχύουν αυτά τα ενδεχόμενα, απαραίτητη είναι η παρουσία της PPP3CA μέσα στον πυρήνα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αλλά και από τα πειράματα της μικροσκοπίας ανοσοθορορισμού που διεξήχθησαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, η PPP3CA είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο. Παρόλα αυτά, υπάρχουν δημοσιευμένες παρατηρήσεις που υποστηρίζουν τον εντοπισμό της και εντός του πυρήνα (296), (297).

Ο ρόλος της PDP1 στη ρύθμιση του HIF-1 και στην κυτταρική απόκριση στην υποξία: Η PDP1 είναι μια φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης, η δράση της οποίας ρυθμίζεται από το Mg^{2+} . Πρόκειται για ένα μιτοχονδριακό ένζυμο που διαθέτει μόνο ένα γνωστό υπόστρωμα, την PDH, και έναν πολύ ειδικό ρόλο που είναι η ρύθμιση της λειτουργίας του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDC), και κατ' επέκταση της πορείας του μεταβολισμού (187). Συγκεκριμένα, η PDP1 αποφωσφορυλιώνει την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού, με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί το σύμπλοκο και να προωθεί τον αερόβιο μεταβολισμό και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αντίθετα, η κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, PDK1, φωσφορυλιώνει την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού και αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλόκου, επάγοντας το φαινότυπο Warburg.

Η αναστολή της λειτουργίας του PDC στα καρκινικά κύτταρα διαμεσολαβείται από τη σταθεροποίηση του HIF-1α και έχει συνδεθεί με αυξημένη κακοήθεια σε πολλούς τύπους καρκίνου (298). Η ενεργοποίηση του HIF-1α οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής της PDK1 (205), η οποία ευθύνεται για τη στροφή του μεταβολισμού προς την αναερόβια γλυκόλυση και την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Αποτέλεσε λοιπόν ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα της δοκιμασίας διαλογής, ότι η PDP1 ρυθμίζει τη δράση των HIF, ενώ ο HIF-1 επάγει την PDK1 στην υποξία. Επιπλέον, τα προϊόντα της γλυκόλυσης, όπως το γαλακτικό οξύ ή το πυροσταφυλικό, που συσσωρεύονται εξαιτίας της υψηλής έκφρασης και δράσης της PDK1, προωθούν στη συνέχεια την περαιτέρω ενεργοποίηση του HIF-1 ανεξάρτητα από το οξυγόνο, δημιουργώντας έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης για την πρόοδο της κακοήθειας του όγκου (298). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν τη σύνδεση των μονοπατιών του HIF-1 και της PDK1, και οδηγούν στην υπόθεση της ύπαρξης κάποιας πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ του HIF-1 και του άλλου ρυθμιστικού στοιχείου του PDC, της PDP1.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η χρήση διαφορετικού siRNA από αυτό της δοκιμασίας διαλογής έδειξε ότι η αποσιώπηση της PDP1 μειώνει σημαντικά τη δράση των HIF και τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων των HIF-1 και HIF-2 σε συνθήκες υποξίας, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο τα αποτελέσματα της διαλογής. Η αποσιώπηση της PDP1 προκάλεσε επίσης την αναστολή της μεταγραφής της PDK1, η οποία όπως αναφέρθηκε αποτελεί ειδικό γονίδιο-στόχο του HIF-1 και το δεύτερο ρυθμιστικό στοιχείο του PDC. Αντίθετα, η υπερέκφραση της φωσφατάσης προκάλεσε την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF, προτείνοντας το ρόλο της PDP1 ως ενεργοποιητή της δράσης των HIF στην υποξία.

Προκειμένου να διευκρινιστεί το λειτουργικό αποτέλεσμα της αποσιώπησης ή υπερέκφρασης της PDP1, μελετήθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού. Με βάση τη βιβλιογραφία, θα ήταν αναμενόμενο η αποσιώπηση της PDP1 να επάγει τα φωσφορυλιωμένα επίπεδα της PDH. Ενώ κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε σε συνθήκες νορμοξίας, στην υποξία η απουσία της PDP1 δεν επηρέασε τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης PDH, καθώς όπως δείχθηκε αναστέλλει τη δράση του HIF-1 και τη μεταγραφή της PDK1. Αντίθετα, θα αναμενόταν ότι η υπερέκφραση της PDP1 να μειώνει τη φωσφορυλίωση της PDH, και να επάγει την ενεργοποίηση του PDC. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης PDH που επάγονται από την υποξία και την ενεργοποίηση του HIF-1, δε μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά από υπερέκφραση της PDP1, καθώς βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της φωσφατάσης επάγει τη δράση του HIF-1 κι επομένως και την έκφραση της PDK1, δρώντας αντιρροπιστικά στην υπερέκφραση της PDP1. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν την πιθανή ύπαρξη ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης της λειτουργίας του PDC στην υποξία, που διαμεσολαβείται από την επικοινωνία μεταξύ του HIF-1 και της PDP1.



Εικόνα 84: Μοντέλο αναπαράστασης του πιθανού μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης της λειτουργίας του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDC) στην υποξία. Α) Η αποσιώπηση της PDP1 αναστέλλει τη δράση του HIF-1 και μειώνει τη μεταγραφή της PDK1, με αποτέλεσμα να διατηρούνται σταθερά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης PDH και να μη μεταβάλλεται η λειτουργία του PDC. Β) Η υπερέκφραση της PDP1 α υξάνει την ενεργότητα του HIF-1, ο οποίος στη συνέχεια επάγει τη μεταγραφή της PDK1, με αποτέλεσμα να διατηρούνται σταθερά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης PDH και να μη μεταβάλλεται η λειτουργία του PDC.

Αν και τα πειράματα που διεξήχθησαν δεν αποκαλύπτουν πλήρως το μηχανισμό μέσω του οποίου η ενεργοποίηση της PDP1 επάγει τους HIF, έγινε ξεκάθαρο ότι η PDP1 δεν εμπλέκεται στο στάδιο ρύθμισης της έκφρασης και σταθερότητας των HIF-α, καθώς ούτε η αποσιώπηση ούτε η υπερέκφραση της προκάλεσαν τη μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων των HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες υποξίας. Επίσης,δείχθηκε ότι η αποσιώπηση της PDP1 δεν επηρέασε τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α και τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT. Εάν θεωρηθεί ότι η PDP1 επηρεάζει άμεσα τον HIF-1 και προκαλεί αύξηση της

δράσης του, θα πρέπει να αντιστρέφει κάποια ανασταλτική φωσφορυλίωση του HIF-1α, η οποία να οδηγεί σε μείωση της ενεργοποίησής του, χωρίς να προκαλεί την αποσταθεροποίησή του ή να παρεμποδίζει τη σύνδεσή του με τον ARNT. Ωστόσο, ένα τέτοιο ενδεχόμενο δεν υποστηρίχθηκε από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, καθώς δεν ανιχνεύθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF-1α και της PDP1 σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Επιπλέον, η άμεση αλληλεπίδραση των δύο μορίων θα προϋπέθετε τον συνεντοπισμό τους μέσα στον πυρήνα, όπου συσσωρεύεται ο HIF-1α σε συνθήκες υποξίας. Σύμφωνα, όμως, με τη βιβλιογραφία αλλά και με τα πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, η PDP1 (PDP1-GFP) εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Παρόλα αυτά, σε μια πρόσφατη δημοσίευση υποστηρίζεται η μετατόπιση του PDC από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα και η παρουσία ενός μικρού κλάσματος της PDP1 και μέσα στον πυρήνα (207).

Από τα δεδομένα μας, πιθανότερο είναι το ενδεχόμενο η PDP1 να εξασκεί τη θετική της επίδραση στη δράση του HIF-1 έμμεσα, αποφωσφορυλιώνοντας άλλους παράγοντες που ελέγχουν τη μεταγραφική του ενεργότητα. Θα μπορούσε για παράδειγμα να αναστέλλει τη δράση κάποιου μορίου που ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποίηση του HIF-1 (καταστολέα), ή να επάγει τη λειτουργία κάποιου συμπαραγόντα της μεταγραφής. Πέρα από αυτό, η δράση του HIF-1 μπορεί να ρυθμίζεται έμμεσα και από τα προϊόντα του μεταβολισμού. Έχειδειχθεί ότι το γαλακτικό οξύ, το πυροσταφυλικό οξύ, το οξαλοξικό οξύ, το φουμαρικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ προωθούν την ενεργοποίηση του HIF-1α με διαφορετικούς τρόπους (298). Έτσι, μεταβολικά προϊόντα που προκύπτουν από την αυξημένη λειτουργία της PDP1 και κατ' επέκταση του PDC, θα μπορούσαν να επάγουν τη δράση του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας.

Ανακεφαλαιώνοντας, στο πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής ταυτοποιήθηκε ότι η καταλυτική υπομονάδα της φωσφατάσης PPP3CA λειτουργεί ως ενζυμικός αναστολέας της δράσης των HIF και της έκφρασης των γονιδίων-στόχων της υποξίας. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκε η φωσφατάση PDP1, ως ενεργοποιητής της δραστηριότητας των HIF σε συνθήκες υποξίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, και οι δύο φωσφατάσες φάνηκε να ρυθμίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με έμμεσο μηχανισμό, που δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης, τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α και το διμερισμό του με τον ARNT, αλλά πιθανόν επηρεάζει την αλληλεπίδραση με κάποια άλλη πρωτεΐνη. Τα δεδομένα, αν και πρώιμα, έδειξαν ότι η καλσινευρίνη συνδέει τη συγκέντρωση του ασβεστίου με το μονοπάτι της υποξίας, ενώ η PDP1 μεσολαβεί την επικοινωνία μεταξύ πυρήνα και μιτοχονδρίου. Περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την επίδραση των φωσφατασών PPP3CA και PDP1 στη δράση των HIF, θα παράσχει όχι μόνο σημαντικές

λεπτομέρειες σχετικά με τη διασταύρωση των σηματοδοτικών μονοπατιών που διαμεσολαβούν την κυτταρική απόκριση στην υποξία, αλλά και νέους θεραπευτικούς στόχους για ασθένειες που σχετίζονται με την υποξία και τον καρκίνο.

ΜΕΡΟΣ Β'

Στα πλαίσια της μελέτης του μηχανισμού της φωσφορυλίωσης, το δεύτερο μέρος της διατριβής εστιάστηκε συγκεκριμένα στη διερεύνηση του ρόλου της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2, στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 στα κατάλοιπα Ser641 και Ser643 καλύπτει το γειτονικό στις θέσεις φωσφορυλίωσης NES και καταστέλλει τη λειτουργία του με αποτέλεσμα να οδηγεί στη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα και στην αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας (34). Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η ενεργοποίηση του μονοπατιού του HIF-1 καθιστά τους υποξικούς όγκους επιθετικούς και ανθεκτικούς στις συμβατικές μεθόδους χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας. Ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα σημαντική η διευκρίνιση του ρόλου της ενεργοποιητικής φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2 στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία και στην προώθηση της ογκογένεσης.

Η προσέγγιση που επιλέχθηκε για τη μελέτη της σημασίας της τροποποίησης αυτής, ήταν η αναστολή της λειτουργίας του HIF-1α που ελέγχεται από τη φωσφορυλίωση. Οι χημικοί αναστολείς της δράσης των ERK1/2 και της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από αυτές, μπορούν να εμποδίσουν αποτελεσματικά την ενεργοποίηση του HIF-1 (127, 132, 133), ωστόσο δε θεωρούνται ειδικοί, κι ως εκ τούτου δε μπορούν να διασφαλίσουν ότι η παρατηρούμενη επίδραση οφείλεται σε αναστολή της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2, κι όχι στην αναστολή της φωσφορυλίωσης οποιασδήποτε άλλης πρωτεΐνης-στόχου των ERK1/2. Για το σκοπό αυτό, στην παρούσα μελέτη κατασκευάστηκαν νέοι πεπτιδικοί αναστολείς, βασισμένοι στην περιοχή ETD του HIF-1α. Η περιοχή ETD (αμινοξέα 616-658) είναι μέρος της ανασταλτικής περιοχής (ID) του HIF-1α (αμινοξέα 576-785), η οποία όταν απαλείφεται έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γειτονικών TAD περιοχών (27). Η περιοχή αυτή αποτελεί το υπόστρωμα των ERK1/2 και σύμφωνα με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιοχημείας η υπερέκφραση της ως ανεξάρτητο πολυπεπτιδίο στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa, Huh7 και HepG2 ανέστειλε τη δράση του HIF-1 (34, 236, 286). Η χρήση της περιοχής ETD ως αναστολέα, προϋπέθετε τη χορήγησή της στα κύτταρα ως πεπτιδίο που διαθέτει κυτταροδιεισδυτική ικανότητα. Για το

σκοπό αυτό, οι διάφορες μορφές της περιοχής ETD παράχθηκαν ως καθαρά πεπτίδια σε σύντηξη με το πεπτίδιο TAT του ιού HIV.

Παρατηρήθηκε, ότι η σύντηξη των διαφόρων μορφών του πεπτιδίου ETD με την αλληλουχία TAT, δεν επηρέασε τη συμπεριφορά τους, όπως αυτή παρατηρήθηκε μετά από διαμόλυνση με το cDNA των πεπτιδίων ETD και τη σύνθεσή τους μέσα στα κύτταρα. Συγκεκριμένα, οι μορφές του πεπτιδίου ETD που μπορούν να φωσφορυλιωθούν (TAT-ETD wt και TAT-ETD IA) ή μιμούνται τη φωσφορυλίωση (TAT-ETD SE) εμφανίστηκαν κυρίως πυρηνικές, προκάλεσαν τη μετατόπιση ενός μεγάλου κλάσματος του ενδογενούς HIF-1α στο κυτταρόπλασμα και ανέστειλαν σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας. Αντίθετα, η μορφή του πεπτιδίου στο οποίο έχουν καταργηθεί οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (TAT-ETD SA) εντοπίστηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα και δεν επηρέασε τον πυρηνικό εντοπισμό και την ενεργότητα του HIF-1α, γι' αυτό και λειτούργησε ως αρνητικό κοντρόλ.

Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν και επιβεβαιώνουν τα προηγούμενα δεδομένα σχετικά με την παρουσία ενός ρυθμιζόμενου από τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 σήματος εξαγωγής από τον πυρήνα μέσα στην περιοχή ETD του HIF-1α ως μοριακού διακόπτη (34). Επομένως, η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων TAT-ETD wt και TAT-ETD IA μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητά τους να ανταγωνίζονται τον ενδογενή HIF-1α για τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2, καθώς, αποτελούν τα ίδια υπόστρωμα των κινασών και αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση του, προκαλώντας έτσι, την εξαγωγή του στο κυτταρόπλασμα με τρόπο που εξαρτάται από τη CRM1. Επιπλέον, ο πυρηνικός εντοπισμός και η ανασταλτική δράση του φωσφομιμητικού πεπτιδίου TAT-ETD SE, αποτελεί την επιβεβαίωση ότι τα πεπτίδια ETD δεν αναστέλλουν τη δράση των ERK1/2, αλλά αποτελούν ειδικούς αναστολείς του HIF-1α. Το συγκεκριμένο πεπτίδιο δεν ανταγωνίζεται τον ενδογενή HIF-1α για τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2, αλλά πιθανόν για μια σημαντική αλληλεπίδραση με κάποια πυρηνική πρωτεΐνη. Έτσι, ο εντοπισμός και ανασταλτική ικανότητα του συγκεκριμένου πεπτιδίου αποκαλύπτει ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 είναι απαραίτητη για την δέσμευσή του με κάποιον πυρηνικό παράγοντα, ο οποίος λειτουργεί σαν συνενεργοποιητής της μεταγραφής.

Επιπλέον,δείχθηκε ότι τα πεπτίδια TAT-ETD ανέστειλαν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων, που ελέγχονται από το μονοπάτι του HIF-1. Μία από αυτές είναι η αλλαγή του μεταβολισμού των λιπιδίων σε συνθήκες υποξίας, η οποία χαρακτηρίζεται από την αυξημένη σύνθεση τριγλυκεριδίων. Η διαδικασία αυτή διαμεσολαβείται από τον HIF-1, μέσω της επαγωγής της έκφρασης ενζύμων του

βιοσυνθετικού μονοπατιού των τριακυλογλυκερολών, όπως η AGPAT2 και η λιπίνη 1 (236). Η συσσώρευση λιποσταγονιδίων είναι σημαντική για την επιβίωση των κυττάρων (122, 237), καθώς, η σύνθεση των ουδέτερων λιπιδίων περιορίζει την κυτταροτοξικότητα των ελεύθερων λιπαρών οξέων, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των οποίων αυξάνεται στην υποξία εξαιτίας της αυξημένης πρόσληψης τους και της καταστολής της β-οξειδωσης (232, 233). Επιπλέον τα πεπτίδια TAT-ETD ανέστειλαν σημαντικά την ικανότητα μετανάστευσης και την κλωνογονικότητα των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας, διαδικασίες που διαμεσολαβούνται επίσης από τον HIF-1 και είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία νέων μεταστατικών εστιών. Ο HIF-1 ρυθμίζει την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας επιφάνειας για την επίτευξη της μετανάστευσης των κυττάρων και επάγει την ανάπτυξη κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος για το σχηματισμό όγκου (1).

Όπως ήταν αναμενόμενο, αναστέλλοντας αυτούς τους σημαντικούς προσαρμοστικούς μηχανισμούς, τα πεπτίδια TAT-ETD μείωσαν σημαντικά την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η επίδραση με τα πεπτίδια TAT-ETD προκάλεσε την αύξηση του κυτταρικού θανάτου μέσω της επαγωγής του μονοπατιού της απόπτωσης σε συνθήκες υποξίας, σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές (HeLa, Huh7 και HepG2).

Την ισχυρότερη επίδραση εκδήλωσε η μορφή TAT-ETD IA σε σχέση με τις υπόλοιπες μορφές των κυτταροδιαδυσδυτικών πεπτιδίων, σε όλα τα βιολογικά τεστ που πραγματοποιήθηκαν. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις μεταλλάξεις που καταστρέφουν το NES του πεπτιδίου αυτού, εξασφαλίζοντας έτσι τη συσσώρευσή του αποκλειστικά μέσα στον πυρήνα, γεγονός που επιτρέπει την αποτελεσματικότερη φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2 και, άρα, τη μεγαλύτερη αναστολή της δράσης του HIF-1α. Στην παρούσα διατριβή κατασκευάστηκε επίσης ένα πολύ καλό αρνητικό κοντρόλ, η μορφή TAT-ETD SA, στην οποία οι δύο σερίνες-στόχοι των ERK1/2 έχουν αντικατασταθεί από αλανίνες, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να φωσφορυλιωθεί. Η αδυναμία του πεπτιδίου αυτού, που διαφέρει μόνο σε δύο κατάλοιπα σερίνης από την αγρίου τύπου μορφή, να αναστείλει τη δράση του HIF-1, τις βιολογικές λειτουργίες και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, επιβεβαιώνει ότι τα πεπτίδια ETD λειτουργούν παρεμποδίζοντας λειτουργίες που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2.

Δεδομένου του αρνητικού ρόλου που διαδραματίζει ο HIF-1 στην ανάπτυξη των όγκων, η αναστολή της δράσης του προσφέρει μια ελκυστική προσέγγιση για τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται στο υποξικό μικροπεριβάλλον των στερεών όγκων (208, 222). Η δοκιμαστική εφαρμογή ενώσεων που στοχεύουν τη σταθεροποίηση της

υπομονάδας HIF-α ή τη σύνδεσής της με τον ARNT ή τους συμπαράγοντες της μεταγραφής p300/CBP, έχει επιβεβαιώσει ότι οι ισομορφές των HIF-α αποτελούν ελκυστικούς στόχους για αντικαρκινική θεραπεία (252, 253, 299). Έτσι, η ανάπτυξη ειδικών αναστολέων των HIF, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τις παραδοσιακές θεραπευτικές μεθόδους ή άλλες στοχευμένες στρατηγικές, είναι πολύ σημαντική. Παρόλα αυτά, δεν έχει επιτευχθεί μέχρι τώρα η ανάπτυξη κάποιου απολύτως εξειδικευμένου αναστολέα του HIF-1 που να μην έχει παράπλευρες ανεπιθύμητες δράσεις. Η συγκεκριμένη προσέγγιση προσκρούει στο γεγονός ότι η αναστολή των μεταγραφικών παραγόντων δεν είναι εύκολη. Σε αντίθεση με τα ένζυμα που μπορούν να στοχευθούν ειδικά από ουσίες που μοιάζουν με το υπόστρωμά τους ή τους φυσικούς τους αναστολείς, η λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων εξαρτάται από τις τροποποιήσεις τους και την αλληλεπίδραση τους με άλλες πρωτεΐνες ή με το DNA, γεγονότα που δε μπορούν να παρεμποδιστούν εύκολα από μικρού μεγέθους χημικούς αναστολείς (300, 301).

Στο κομμάτι της ανάπτυξης θεραπευτικών προσεγγίσεων ενάντια στον καρκίνο, έχουν εφαρμοστεί πολλές στρατηγικές για την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του HIF-1. Κάποιες υπό δοκιμή ουσίες αναστέλλουν απευθείας τον HIF-1, ενώ άλλες αναστέλλουν σηματοδοτικά μονοπάτια που τον ρυθμίζουν θετικά (222, 249). Ορισμένες προσεγγίσεις στοχεύουν την έκφραση του HIF-1, όπως με τη χρήση αντινοσηματικών μορίων RNA (255) ενώ, άλλες προωθούν την αποσταθεροποίησή του με ουσίες που καταργούν την αλληλεπίδραση του με τη μοριακή συνοδό Hsp90 (79). Παρόλα αυτά, οι παράγοντες αυτοί δεν θεωρούνται επιλεκτικοί αναστολείς του HIF-1, καθώς η ανασταλτική τους δράση δεν περιορίζεται μόνο στο σηματοδοτικό μονοπάτι της υποξίας, αλλά προκαλούν τη θανάτωση και κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (208).

Μία άλλη κατηγορία ενώσεων που αναστέλλουν τον HIF-1 συμπεριλαμβάνει ουσίες που στοχεύουν συστατικά του μονοπατιού τη υποξίας όπως ο ARNT (263), οι p300/CBP (257) και τα HRE (264). Ωστόσο, ούτε οι ουσίες αυτές θεωρούνται ειδικοί αναστολείς του HIF-1, καθώς τα παραπάνω συστατικά του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία είναι κοινά μεταξύ όλων των ισομορφών HIF-α, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν και μονοπάτια ανεξάρτητα της υποξίας (302, 303).

Μια εναλλακτική και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη εκλεκτική στόχευση των μεταγραφικών παραγόντων, είναι η χρήση της τεχνολογίας πρωτεϊνικής μεταγωγής σε συνδυασμό με πεπτίδια, που προέρχονται από μια αλληλουχία η οποία έχει δειχθεί πειραματικά ότι διαθέτει ανασταλτική δράση έναντι του μεταγραφικού παράγοντα (258, 304, 305). Σε ανεξάρτητες μελέτες έχουν αναφερθεί πεπτίδια τα οποία λειτουργούν ως αναστολείς

του HIF-1. Τέτοια είναι τα πεπτίδια 6His-Tat-Ainp1 και TAD-C, τα οποία ανταγωνίζονται τον HIF-1α για τη σύνδεση με τον ARNT και παρεμποδίζουν τη δέσμευση των p300/CBP με την περιοχή C-TAD του HIF-1α, αντίστοιχα (258, 271). Παρόλο που τα πεπτίδια αυτά αναστέλλουν αποτελεσματικά τον HIF-1, αναστέλλουν λειτουργίες κοινές μεταξύ των ισομορφών του HIF. Επίσης, μπορεί να επηρεάζουν τη λειτουργία και άλλων μεταγραφικών παραγόντων που χρησιμοποιούν τους ίδιους εταίρους, όπως ο AhR που αλληλεπιδρά με τον ARNT, γεγονός που επηρεάζει την εξειδίκευση και την αποτελεσματικότητα του αναστολέα.

Οι πεπτιδικοί αναστολείς TAT-ETD του HIF-1 που κατασκευάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, βασίστηκαν σε μια περιοχή του HIF-1α η οποία ρυθμίζεται από τις ERK1/2 και δείχθηκε ότι διαθέτουν την απαραίτητη εξειδίκευση για να δράσουν ως επιλεκτικοί αναστολείς του HIF-1, χωρίς να επηρεάζουν τις άλλες ισομορφές αυτού του μεταγραφικού παράγοντα. Επίσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα πεπτίδια αυτά δεν αναστέλλουν τη δράση των ERK1/2, καθώς σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν επηρέασαν τα φωσφορυλιωμένα επίπεδα των κινασών αυτών. Επιπλέον, τα πεπτίδια TAT-ETD φάνηκε να παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα και ως προς την ισομορφή των HIF που αναστέλλουν. Συγκεκριμένα, τα πυρηνικά πεπτίδια ETD ανέστειλαν την έκφραση κοινών γονιδίων-στόχων των HIF, αλλά και γονιδίων που επάγονται αποκλειστικά από τον HIF-1. Αντίθετα, δεν επηρέασαν καθόλου την έκφραση των ειδικών γονιδίων-στόχων του HIF-2 σε συνθήκες υποξίας (10, 287), δείχνοντας την υψηλή εξειδίκευσή τους ενάντια στον HIF-1α. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι παρά τη δομική τους ομοιότητα, οι δύο HIF-α ισομορφές διαφέρουν σημαντικά στην περιοχή που εδράζεται το τμήμα της ETD που περιέχει το NES και τα δύο κατάλοιπα σερίνης που τροποποιούνται από τις ERK1/2 (127). Η υψηλή αυτή επιλεκτικότητα της δράσης των πεπτιδίων ETD ως ειδικών αναστολέων του HIF-1, πέρα από την αξιοποίησή του ως αντικαρκινικούς παράγοντες, τα καθιστά επίσης χρήσιμα βιοχημικά εργαλεία για τη μελέτη των διακριτών λειτουργιών των HIF-1α και HIF-2α (3, 287) και για την πρόσφατα χαρακτηρισμένη μη γενωμική δράση του HIF-1α στα μιτοχόνδρια (133, 306).

Τέλος, πέρα από τη δραστηριότητα τους ως αναστολείς του HIF-1α, παρατηρήθηκε ότι τα πεπτίδια ETD αναστέλλουν την επιβίωση αποκλειστικά των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται σε συνθήκες υποξίας. Αντίθετα, σε συνθήκες νορμοξίας, όπου ο HIF-1α απουσιάζει, δεν προκάλεσαν καμία μεταβολή. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει περαιτέρω τη δράση τους ως ειδικών αναστολέων του HIF. Έτσι, τα πεπτίδια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως η βάση για την παραγωγή αντικαρκινικών παραγόντων που να στοχεύουν τους υποξικούς όγκους αλλά όχι τα φυσιολογικά νορμοξικά κύτταρα (304).

Αντίθετα με τον καρκίνο, υπάρχουν παθολογικές καταστάσεις όπως η ισχαιμία και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, όπου η ενεργοποίηση του HIF-1 είναι απαραίτητη. Έτσι, έχουν δοκιμασθεί κυτταροδιαδυσδυτικά πεπτίδια του HIF-1α, που επιτυγχάνουν την επαγωγή της δράσης του ενδογενούς HIF-1. Τέτοια είναι πεπτίδια που προέρχονται από την περιοχή ODD του HIF-1α, τα οποία βρίσκονται σε σύντηξη με την αλληλουχία TAT και επάγουν τη σταθεροποίηση του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας και την έκφραση των γονιδίων-στόχων του HIF-1. Αποτελώντας τα ίδια τα πεπτίδια υπόστρωμα των PHD, υδροξυλιώνονται και ανταγωνίζονται με τον ενδογενή HIF-1α για την αλληλεπίδραση με τον pVHL. Έτσι, ο HIF-α δεν αποικοδομείται και προωθείται η αγγειογένεση (307, 308). Άρα η κατανόηση των μοριακών μονοπατιών και κυρίως του ρόλου των μηχανισμών της φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης που επηρεάζουν και ενεργοποιούν τους HIF είναι ιδιαίτερα σημαντικά.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα συνολικά, στο πρώτο μέρος της διατριβής ταυτοποιήθηκαν δύο φωσφατάσες που επηρεάζουν τη δράση των HIF στην υποξία, με κάποιον, πιθανόν έμμεσο μηχανισμό, που δεν έχει καταστεί σαφής και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Η μία είναι η καλσινευρίνη, η οποία αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF και η άλλη είναι η μιτοχονδριακή PDP1 η οποία ενεργοποιεί τους HIF στην υποξία. Στα πλαίσια του δεύτερου μέρους, διευκρινίστηκε ότι η ενεργοποιητική φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 είναι καθοριστικής σημασίας για τη διεκπεραίωση σημαντικών βιολογικών λειτουργιών που εξασφαλίζουν την προσαρμογή και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Δείχθηκε ότι τα κυτταροδιαδυσδυτικά πεπτίδια που προέρχονται από την ETD περιοχή του HIF-1α και έχουν την ικανότητα να ανταγωνίζονται με τον ενδογενή HIF-1α για τη φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2, αναστέλλουν βασικές βιολογικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων και επάγουν την απόπτωση τους στην υποξία. Επιπλέον, φάνηκε ότι τα πεπτίδια αυτά αποτελούν επιλεκτικούς αναστολείς της δράσης του HIF-1, χωρίς να διαθέτουν ανεπιθύμητες μη-ειδικές επιδράσεις. Έτσι, μπορούν να αποτελέσουν αφενός πολύτιμα εργαλεία για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2, και αφετέρου, πρότυπες ενώσεις για την κατασκευή ειδικών αναστολέων του HIF-1 με εφαρμογή στην αντικαρκινική θεραπεία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Amelio I. The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis*. 2018 Jan 24;7(1):10.
2. Semenza GL. Novel strategies for cancer therapy. *J Mol Med (Berl)*. 2016 Feb;94(2):119-20.
3. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews Cancer*. 2012 Jan;12(1):9-22.
4. Dengler VL, Galbraith MD, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2014 Jan-Feb;49(1):1-15.
5. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*. 1993 Oct 15;268(29):21513-8.
6. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Jun 6;92(12):5510-4.
7. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A Novel bHLH-PAS Factor with Close Sequence Similarity to Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF1); Regulates the VEGF, Expression and is Potentially Involved in Lung and Vascular Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(9):4273-8.
8. Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*. 1997 Apr;63(1):51-60.
9. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development*. 1997 Jan 1;11(1):72-82.
10. Befani C, Liakos P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *J Cell Physiol*. 2018 Jul 3.
11. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene expression*. 1998;7(3):205-13.
12. Yang H, Xia Q, Zou Y, Wang K, Jiang W, Cai Y. M410, a combretastatin A4 analogue, disrupts microtubules and inhibits HIF-1alpha in human breast cancer cells. *Oncology reports*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2015 Jul;34(1):334-40.
13. Heikkila M, Pasanen A, Kivirikko KI, Myllyharju J. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha variants in the hypoxia response. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Dec;68(23):3885-901.
14. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem*. 2002 Sep 6;277(36):32405-8.
15. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005 Sep;19(11):1396-406.
16. Pasanen A, Heikkila M, Rautavuoma K, Hirsila M, Kivirikko KI, Myllyharju J. Hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha is subject to extensive alternative splicing in human

- tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2. The international journal of biochemistry & cell biology. 2010 Jul;42(7):1189-200.
17. Hankinson O. Why does ARNT2 behave differently from ARNT? Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2008 May;103(1):1-3.
 18. Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin α/β pathway. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2008 3//;1783(3):394-404.
 19. Mandl M, Depping R. Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1beta): is it a rare exception? Mol Med. [Review]. 2014 May 27;20:215-20.
 20. Wolff M, Jelkmann W, Dunst J, Depping R. The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1beta) is influenced by hypoxia and hypoxia-mimetics. Cell Physiol Biochem. 2013;32(4):849-58.
 21. Mandl M, Kapeller B, Lieber R, Macfelda K. Hypoxia-inducible factor-1beta (HIF-1beta) is upregulated in a HIF-1alpha-dependent manner in 518A2 human melanoma cells under hypoxic conditions. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Apr 26;434(1):166-72.
 22. Choudhry H, Harris AL. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. Cell Metab. 2018 Feb 6;27(2):281-98.
 23. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, et al. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. J Biol Chem. 2009 Jun 19;284(25):16767-75.
 24. Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. Blood. 2011 Jun 9;117(23):e207-17.
 25. Schodel J, Mole DR, Ratcliffe PJ. Pan-genomic binding of hypoxia-inducible transcription factors. Biol Chem. 2013 Apr;394(4):507-17.
 26. Xia X, Kung AL. Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia. Genome Biol. 2009;10(10):R113.
 27. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. J Biol Chem. 1997 Aug 1;272(31):19253-60.
 28. Zhang M, Li W, Yu L, Wu S. The suppressive effect of resveratrol on HIF-1alpha and VEGF expression after warm ischemia and reperfusion in rat liver. PLoS One. 2014;9(10):e109589.
 29. Smirnova NA, Hushpulia DM, Speer RE, Gaisina IN, Ratan RR, Gazaryan IG. Catalytic mechanism and substrate specificity of HIF prolyl hydroxylases. Biochemistry Biokhimiia. 2012 Oct;77(10):1108-19.
 30. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. EMBO J. 1998 Nov 16;17(22):6573-86.
 31. Depping R, Jelkmann W, Kosyna FK. Nuclear-cytoplasmatic shuttling of proteins in control of cellular oxygen sensing. J Mol Med (Berl). 2015 Jun;93(6):599-608.
 32. Luo JC, Shibuya M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). Oncogene. 2001 Mar 22;20(12):1435-44.

33. Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Gorlich D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 11;390(2):235-40.
34. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *J Biol Chem*. 2008 Oct 10;283(41):27620-7.
35. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Apr;33(4):207-14.
36. Brahimi-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2011 Feb;21(1):67-72.
37. Culley MK, Chan SY. Mitochondrial metabolism in pulmonary hypertension: beyond mountains there are mountains. *The Journal of clinical investigation*. 2018 Aug 31;128(9):3704-15.
38. Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jun;296(6):E1195-209.
39. Pugh CW, Ratcliffe PJ. New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp Cell Res*. 2017 Jul 15;356(2):116-21.
40. Pawlus MR, Hu CJ. Enhanceosomes as integrators of hypoxia inducible factor (HIF) and other transcription factors in the hypoxic transcriptional response. *Cellular signalling*. 2013 Sep;25(9):1895-903.
41. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci*. 2012 Sep;37(9):364-72.
42. Koh MY, Lemos R, Jr., Liu X, Powis G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res*. 2011 Jun 1;71(11):4015-27.
43. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology*. 2003 Dec;23(24):9361-74.
44. Villa JC, Chiu D, Brandes AH, Escorcía FE, Villa CH, Maguire WF, et al. Nontranscriptional role of Hif-1 α in activation of gamma-secretase and notch signaling in breast cancer. *Cell Rep*. 2014 Aug 21;8(4):1077-92.
45. Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Molecular biology of the cell*. 2007 Nov;18(11):4528-42.
46. Wang X, Schneider A. HIF-2 α -mediated activation of the epidermal growth factor receptor potentiates head and neck cancer cell migration in response to hypoxia. *Carcinogenesis*. 2010 Jul;31(7):1202-10.
47. Salnikow K, Aprelikova O, Ivanov S, Tackett S, Kaczmarek M, Karaczyn A, et al. Regulation of hypoxia-inducible genes by ETS1 transcription factor. *Carcinogenesis*. 2008 Aug;29(8):1493-9.
48. Pawlus MR, Wang L, Ware K, Hu CJ. Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2 α (HIF2 α) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*. 2012 Nov;32(22):4595-610.
49. Koizume S, Ito S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Sakuma Y, et al. HIF2 α -Sp1 interaction mediates a deacetylation-dependent FVII-gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells. *Nucleic Acids Research*. 2012 Jul;40(12):5389-401.
50. Law M, Cardoso RM, Wilson IA, Burton DR. Antigenic and immunogenic study of membrane-proximal external region-grafted gp120 antigens by a DNA prime-protein boost immunization strategy. *J Virol*. 2007 Apr;81(8):4272-85.

51. Galbraith MD, Allen MA, Bensard CL, Wang X, Schwinn MK, Qin B, et al. HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1327-39.
52. Villar D, Ortiz-Barahona A, Gomez-Maldonado L, Pescador N, Sanchez-Cabo F, Hackl H, et al. Cooperativity of stress-responsive transcription factors in core hypoxia-inducible factor binding regions. *PLoS One*. 2012;7(9):e45708.
53. Kim KK, Abelman S, Yano N, Ribeiro JR, Singh RK, Tipping M, et al. Tetrathiomolybdate inhibits mitochondrial complex IV and mediates degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer cells. *Sci Rep*. 2015 Oct 15;5:14296.
54. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science (New York, NY)*. 2001 Apr 20;292(5516):464-8.
55. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 9;338(1):617-26.
56. Shen C, Kaelin WG, Jr. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2013 Feb;23(1):18-25.
57. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *The Biochemical journal*. 2004 Nov 1;383(Pt. 3):429-37.
58. Masson N, Ratcliffe PJ. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab*. 2014;2(1):3.
59. Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM. The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3688-98.
60. Bracken CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML, et al. Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J Biol Chem*. 2006 Aug 11;281(32):22575-85.
61. Azimi I. The interplay between HIF-1 and calcium signalling in cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2018 Apr;97:73-7.
62. Mylonis I, Simos G. The Involvement of the ERK-Hypoxia-Angiogenesis Axis and HIF-1 in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatocellular Carcinoma - Basic Research*, Dr Joseph WY Lau (Ed). 2012:253-74.
63. Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:11.
64. Gorlach A, Bonello S. The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *The Biochemical journal*. 2008 Jun 15;412(3):e17-9.
65. Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, et al. Differential activation and antagonistic function of HIF-{alpha} isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes & development*. 2010 Mar 1;24(5):491-501.
66. Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007 Apr;27(4):755-61.
67. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Molecular biology of the cell*. 2007 Dec;18(12):4691-7.

68. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature*. 2008 Jun 5;453(7196):807-11.
69. D'Ignazio L, Batie M, Rocha S. TNFSF14/LIGHT, a Non-Canonical NF-kappaB Stimulus, Induces the HIF Pathway. *Cells*. 2018 Aug 8;7(8).
70. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*. 2007 Jul 13;282(28):20059-63.
71. Niu G, Briggs J, Deng J, Ma Y, Lee H, Kortylewski M, et al. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 α RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2008 Jul;6(7):1099-105.
72. Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, et al. eIF2 α Kinase PKR Modulates the Hypoxic Response by Stat3-Dependent Transcriptional Suppression of HIF-1 α . *Cancer Research*. 2010;70(20):7820-9.
73. Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci*. 2018 Mar;109(3):560-71.
74. Masoud GN, Li W. HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Sep;5(5):378-89.
75. Bardos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochimica et biophysica acta*. 2005 Jul 25;1755(2):107-20.
76. Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem*. 2015 May;116(5):696-703.
77. Murphy CL, Thoms BL, Vaghjiani RJ, Lafont JE. Hypoxia. HIF-mediated articular chondrocyte function: prospects for cartilage repair. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):213.
78. Dehne N, Brune B. Sensors, transmitters, and targets in mitochondrial oxygen shortage-a hypoxia-inducible factor relay story. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 10;20(2):339-52.
79. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem*. 2002 Aug 16;277(33):29936-44.
80. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer cell*. 2005 Jan;7(1):77-85.
81. Laukka T, Mariani CJ, Ihantola T, Cao JZ, Hokkanen J, Kaelin WG, Jr., et al. Fumarate and Succinate Regulate Expression of Hypoxia-inducible Genes via TET Enzymes. *J Biol Chem*. 2016 Feb 19;291(8):4256-65.
82. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2002 Jun 28;277(26):23111-5.
83. Dehne N, Hintereder G, Brune B. High glucose concentrations attenuate hypoxia-inducible factor-1alpha expression and signaling in non-tumor cells. *Exp Cell Res*. 2010 Apr 15;316(7):1179-89.
84. Lu MJ, Chang H, Chang CC, Wang BW, Shyu KG. Temporal and spatial expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor in a rat model of myocardial ischemia with or without reperfusion. *J Formos Med Assoc*. 2005 Oct;104(10):707-14.
85. Yang M, Su H, Soga T, Kranc KR, Pollard PJ. Prolyl hydroxylase domain enzymes: important regulators of cancer metabolism. *Hypoxia (Auckl)*. 2014;2:127-42.

86. Puissegur MP, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, Robbe-Sermesant K, et al. miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ.* 2011 Mar;18(3):465-78.
87. Kelly TJ, Souza AL, Clish CB, Puigserver P. A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1alpha stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like. *Molecular and Cellular Biology.* 2011 Jul;31(13):2696-706.
88. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J.* 2017 Feb 1;36(3):252-9.
89. Semenza GL. A compendium of proteins that interact with HIF-1alpha. *Exp Cell Res.* 2017 Jul 15;356(2):128-35.
90. Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, et al. Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS letters.* 1999 Oct 29;460(2):251-6.
91. Liu YV, Semenza GL. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell cycle (Georgetown, Tex).* 2007 Mar 15;6(6):656-9.
92. Amir S, Wang R, Simons JW, Mabjeesh NJ. SEPT9_v1 Up-regulates Hypoxia-inducible Factor 1 by Preventing Its. *J Biol Chem.* 2009 Apr 24;284(17):11142-51.
93. Baek JH, Liu YV, McDonald KR, Wesley JB, Zhang H, Semenza GL. Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1alpha. *J Biol Chem.* 2007 Nov 16;282(46):33358-66.
94. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, et al. MgcRacGAP interacts with HIF-1alpha and regulates its transcriptional activity. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(6):995-1006.
95. Lyberopoulou A, Mylonis I, Papachristos G, Sagris D, Kalousi A, Befani C, et al. MgcRacGAP, a cytoskeleton regulator, inhibits HIF-1 transcriptional activity by blocking its dimerization. *Biochimica et biophysica acta.* 2013 Jun;1833(6):1378-87.
96. Luo W, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget.* 2011 Jul;2(7):551-6.
97. Hitosugi T, Kang S, Vander Heiden MG, Chung TW, Elf S, Lythgoe K, et al. Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci Signal.* 2009 Nov 17;2(97):ra73.
98. Lee JS, Kim Y, Bhin J, Shin HJ, Nam HJ, Lee SH, et al. Hypoxia-induced methylation of a pontin chromatin remodeling factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011 Aug 16;108(33):13510-5.
99. Kenneth NS, Mudie S, van Uden P, Rocha S. SWI/SNF regulates the cellular response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2009 Feb 13;284(7):4123-31.
100. Sena JA, Wang L, Hu CJ. BRG1 and BRM chromatin-remodeling complexes regulate the hypoxia response by acting as coactivators for a subset of hypoxia-inducible transcription factor target genes. *Molecular and Cellular Biology.* 2013 Oct;33(19):3849-63.
101. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell.* 2010 Jan 22;140(2):280-93.
102. Yoon H, Lim JH, Cho CH, Huang LE, Park JW. CITED2 controls the hypoxic signaling by snatching p300 from the two distinct activation domains of HIF-1alpha. *Biochimica et biophysica acta.* 2011 Dec;1813(12):2008-16.

103. Sun H, Li XB, Meng Y, Fan L, Li M, Fang J. TRAF6 upregulates expression of HIF-1alpha and promotes tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2013 Aug 1;73(15):4950-9.
104. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* 2002 Nov 27;111(5):709-20.
105. Geng H, Harvey CT, Pittsenbarger J, Liu Q, Beer TM, Xue C, et al. HDAC4 protein regulates HIF1alpha protein lysine acetylation and cancer cell response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2011 Nov 4;286(44):38095-102.
106. Geng H, Liu Q, Xue C, David LL, Beer TM, Thomas GV, et al. HIF1 α Protein Stability Is Increased by Acetylation at Lysine 709. *J Biol Chem.* 2012 Oct 12;287(42):35496-505.
107. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Molecular cell.* 2010 Jun 25;38(6):864-78.
108. Moncada PS. Nitric Oxide And Oxygen: Actions And Interactions In Health And Disease. *Redox Biol.* 2015 Aug;5:421.
109. Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS letters.* 2003 Aug 14;549(1-3):105-9.
110. Cho H, Ahn DR, Park H, Yang EG. Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha. *FEBS letters.* 2007 Apr 17;581(8):1542-8.
111. Berchner-Pfannschmidt U, Yamac H, Trinidad B, Fandrey J. Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2. *J Biol Chem.* 2007 Jan 19;282(3):1788-96.
112. Lisy K, Peet DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ.* 2008 Apr;15(4):642-9.
113. Nunez-O'Mara A, Berra E. Deciphering the emerging role of SUMO conjugation in the hypoxia-signaling cascade. *Biol Chem.* 2013 Apr;394(4):459-69.
114. Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cellular signalling.* 2005 Jan;17(1):1-9.
115. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ETH. SUMO-specific Protease 1 is Essential for Stabilization of Hypoxia-inducible factor-1 α During Hypoxia. *Cell.* 2007 Nov 2;131(3):584-95.
116. Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, et al. Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Nov 5;324(1):394-400.
117. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell.* 2007 Oct 19;131(2):309-23.
118. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Aug 31;360(3):646-52.
119. Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M, Michiels C. Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *International journal of cancer.* 2005 Dec 10;117(5):764-74.
120. Flugel D, Gorchach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Molecular and Cellular Biology.* 2007 May;27(9):3253-65.

121. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci.* 2010 Sep 1;123(Pt 17):2976-86.
122. Kourti M, Ikonomidou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniosoglou S, et al. CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation. *Cellular signalling.* 2015 Jun;27(6):1129-40.
123. Warfel NA, Dolloff NG, Dicker DT, Malysz J, El-Deiry WS. CDK1 stabilizes HIF-1alpha via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell cycle (Georgetown, Tex).* 2013 Dec 1;12(23):3689-701.
124. Bullen JW, Tchernyshyov I, Holewinski RJ, DeVine L, Wu F, Venkatraman V, et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. *Sci Signal.* 2016 May 31;9(430):ra56.
125. Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W. Plk3 Functions as an Essential Component of the Hypoxia Regulatory Pathway by Direct Phosphorylation of HIF-1 α . *J Biol Chem.* 2010 Dec 10;285(50):38944-50.
126. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α . *Molecular cell.* 2010 Nov 24;40(4):509-20.
127. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2006 Nov 3;281(44):33095-106.
128. To KK, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, Huang LE. The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *EMBO J.* 2006 Oct 18;25(20):4784-94.
129. Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem.* 2002 Jun 28;277(26):23508-14.
130. Pangou E, Befani C, Mylonis I, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, et al. HIF-2alpha phosphorylation by CK1delta promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia. *J Cell Sci.* 2016 Nov 15;129(22):4213-26.
131. Dimova EY, Michiels C, Kietzmann T. Kinases as upstream regulators of the HIF system: their emerging potential as anti-cancer drug targets. *Curr Pharm Des.* 2009;15(33):3867-77.
132. Mylonis I, Lakka A, Tsakalof A, Simos G. The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jul 16;398(1):74-8.
133. Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G. Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1alpha to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci.* 2017 Jan 15;130(2):466-79.
134. Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, et al. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS letters.* 2000 Feb 18;468(1):53-8.
135. Mansuy IM, Shenolikar S. Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. *Trends Neurosci.* 2006 Dec;29(12):679-86.
136. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):225-36.
137. Liu YV, Hubbi ME, Pan F, McDonald KR, Mansharamani M, Cole RN, et al. Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J Biol Chem.* 2007 Dec 21;282(51):37064-73.

138. Lang R, Hammer M, Mages J. DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J Immunol.* 2006 Dec 1;177(11):7497-504.
139. Huang XY, Wang HC, Yuan Z, Huang J, Zheng Q. Norepinephrine stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration and invasion via beta-adrenergic receptor-dependent activation of P38/MAPK pathway. *Hepatogastroenterology.* 2012 May;59(115):889-93.
140. Bermudez O, Pages G, Gimond C. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Aug;299(2):C189-202.
141. Zhang Z, Kobayashi S, Borczuk AC, Leidner RS, Laframboise T, Levine AD, et al. Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 2010 Apr;31(4):577-86.
142. Marchetti S, Gimond C, Chambard JC, Touboul T, Roux D, Pouyssegur J, et al. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Molecular and Cellular Biology.* 2005 Jan;25(2):854-64.
143. Jurek A, Amagasaki K, Gembarska A, Heldin CH, Lennartsson J. Negative and positive regulation of MAPK phosphatase 3 controls platelet-derived growth factor-induced Erk activation. *J Biol Chem.* 2009 Feb 13;284(7):4626-34.
144. Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E, Sharp FR. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39728-38.
145. Chappell J, Sun Y, Singh A, Dalton S. MYC/MAX control ERK signaling and pluripotency by regulation of dual-specificity phosphatases 2 and 7. *Genes & development.* 2013 Apr 1;27(7):725-33.
146. Lawan A, Al-Harthi S, Cadalbert L, McCluskey AG, Shweash M, Grassia G, et al. Deletion of the dual specific phosphatase-4 (DUSP-4) gene reveals an essential non-redundant role for MAP kinase phosphatase-2 (MKP-2) in proliferation and cell survival. *J Biol Chem.* 2011 Apr 15;286(15):12933-43.
147. Kovanen PE, Bernard J, Al-Shami A, Liu C, Bollenbacher-Reilley J, Young L, et al. T-cell development and function are modulated by dual specificity phosphatase DUSP5. *J Biol Chem.* 2008 Jun 20;283(25):17362-9.
148. Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, et al. Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nat Immunol.* 2006 Mar;7(3):274-83.
149. Hou PC, Li YH, Lin SC, Lee JC, Lin BW, Liou JP, et al. Hypoxia-Induced Downregulation of DUSP-2 Phosphatase Drives Colon Cancer Stemness. *Cancer Res.* 2017 Aug 15;77(16):4305-16.
150. Bermudez O, Jouandin P, Rottier J, Bourcier C, Pages G, Gimond C. Post-transcriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia. *J Cell Physiol.* 2011 Jan;226(1):276-84.
151. Seta KA, Kim R, Kim HW, Millhorn DE, Beitner-Johnson D. Hypoxia-induced regulation of MAPK phosphatase-1 as identified by subtractive suppression hybridization and cDNA microarray analysis. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30;276(48):44405-12.
152. Liu C, Shi Y, Du Y, Ning X, Liu N, Huang D, et al. Dual-specificity phosphatase DUSP1 protects overactivation of hypoxia-inducible factor 1 through inactivating ERK MAPK. *Exp Cell Res.* 2005 Oct 1;309(2):410-8.
153. Lu H, Tran L, Park Y, Chen I, Lan J, Xie Y, et al. Reciprocal Regulation of DUSP9 and DUSP16 Expression by HIF-1 Controls ERK and p38 MAP Kinase Activity and

- Mediates Chemotherapy-Induced Breast Cancer Stem Cell Enrichment. *Cancer Res.* 2018 Jun 7.
154. Shibasaki F, Hallin U, Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *Journal of biochemistry.* 2002 Jan;131(1):1-15.
 155. Mertz P, Yu L, Sikkink R, Rusnak F. Kinetic and spectroscopic analyses of mutants of a conserved histidine in the metallophosphatases calcineurin and lambda protein phosphatase. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22;272(34):21296-302.
 156. Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13367-70.
 157. White M, Montezano AC, Touyz RM. Angiotensin II signalling and calcineurin in cardiac fibroblasts: differential effects of calcineurin inhibitors FK506 and cyclosporine A. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2012 Feb;6(1):5-14.
 158. Jorgensen KA, Koefoed-Nielsen PB, Karamperis N. Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus. *Scand J Immunol.* 2003 Feb;57(2):93-8.
 159. MacMillan D. FK506 binding proteins: cellular regulators of intracellular Ca²⁺ signalling. *Eur J Pharmacol.* 2013 Jan 30;700(1-3):181-93.
 160. Grigoriou V, Augoulea A, Armeni E, Rizos D, Alexandrou A, Dendrinou S, et al. Prevalence of vasomotor, psychological, psychosomatic and sexual symptoms in perimenopausal and recently postmenopausal Greek women: association with demographic, life-style and hormonal factors. *Gynecol Endocrinol.* 2013 Feb;29(2):125-8.
 161. Cook BA, Warshaw EM. Role of topical calcineurin inhibitors in the treatment of seborrheic dermatitis: a review of pathophysiology, safety, and efficacy. *Am J Clin Dermatol.* 2009;10(2):103-18.
 162. Liu X, Du J, Xi Q. HIF-1alpha ODD polypeptides increased the expression of HIF1 and VEGF in hypoxic rat cortical neuron. *Neurol Sci.* 2011 Dec;32(6):1029-33.
 163. Etzkorn FA, Chang ZY, Stolz LA, Walsh CT. Cyclophilin residues that affect noncompetitive inhibition of the protein serine phosphatase activity of calcineurin by the cyclophilin.cyclosporin A complex. *Biochemistry.* 1994 Mar 8;33(9):2380-8.
 164. Cen J, Wang M, Jiang G, Yin Y, Su Z, Tong L, et al. The new immunosuppressant, isogarcinol, binds directly to its target enzyme calcineurin, unlike cyclosporin A and tacrolimus. *Biochimie.* 2015 Apr;111:119-24.
 165. Cen J, Shi M, Yang Y, Fu Y, Zhou H, Wang M, et al. Isogarcinol is a new immunosuppressant. *PLoS One.* 2013;8(6):e66503.
 166. Liu C, Hermann TE. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem.* 1978 Sep 10;253(17):5892-4.
 167. Oh-hora M, Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 2008 Jun;20(3):250-8.
 168. Stemmer PM, Klee CB. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry.* 1994 Jun 7;33(22):6859-66.
 169. Gooch JL, Barnes JL, Garcia S, Abboud HE. Calcineurin is activated in diabetes and is required for glomerular hypertrophy and ECM accumulation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Jan;284(1):F144-54.
 170. Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell.* 1999 Mar 5;96(5):611-4.
 171. Lee SH, Choi J, Kim H, Lee DH, Roh GS, Kim HJ, et al. FK506 reduces calpain-regulated calcineurin activity in both the cytoplasm and the nucleus. *Anat Cell Biol.* 2014 Jun;47(2):91-100.

172. Heineke J, Ritter O. Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: from the sarcolemma to the nucleus and beyond. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Jan;52(1):62-73.
173. Palkowitsch L, Marienfeld U, Brunner C, Eitelhuber A, Krappmann D, Marienfeld RB. The Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin controls the formation of the Carma1-Bcl10-Malt1 complex during T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 2011 Mar 4;286(9):7522-34.
174. Shibasaki F, McKeon F. Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol.* 1995 Nov;131(3):735-43.
175. Cribbs JT, Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Reports.* 2007 Oct;8(10):939-44.
176. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science (New York, NY).* 1999 Apr 9;284(5412):339-43.
177. Springer JE, Azbill RD, Nottingham SA, Kennedy SE. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J Neurosci.* 2000 Oct 1;20(19):7246-51.
178. Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Molecular and Cellular Biology.* 1999 Aug;19(8):5800-10.
179. Medina DL, Di Paola S, Peluso I, Armani A, De Stefani D, Venditti R, et al. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol.* 2015 Mar;17(3):288-99.
180. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Current opinion in cell biology.* 2001 Apr;13(2):211-7.
181. Yang Y, Song S, Min H, Chen X, Gao Q. STAT3 degradation mediated by calcineurin involved in the neurotoxicity of isoflurane. *Neuroreport.* 2016 Jan 20;27(2):124-30.
182. Murase S. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) degradation by proteasome controls a developmental switch in neurotrophin dependence. *J Biol Chem.* 2013 Jul 12;288(28):20151-61.
183. Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol Chem.* 2005 Apr 1;280(13):12683-9.
184. Halpain S, Hipolito A, Saffer L. Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *J Neurosci.* 1998 Dec 1;18(23):9835-44.
185. Patel MS, Korotchikina LG. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans.* 2006 Apr;34(Pt 2):217-22.
186. Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1990 Nov;4(14):3224-33.
187. Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 May;284(5):E855-62.
188. Harris RA, Huang B, Wu P. Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Adv Enzyme Regul.* 2001;41:269-88.
189. Huang B, Gudi R, Wu P, Harris RA, Hamilton J, Popov KM. Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation. *J Biol Chem.* 1998 Jul 10;273(28):17680-8.
190. Roche TE, Baker JC, Yan X, Hiromasa Y, Gong X, Peng T, et al. Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;70:33-75.

191. Korotchikina LG, Patel MS. Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2001 Oct 5;276(40):37223-9.
192. Karpova T, Danchuk S, Kolobova E, Popov KM. Characterization of the isozymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase: implications for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Biochimica et biophysica acta*. 2003 Dec 1;1652(2):126-35.
193. Turkan A, Hiromasa Y, Roche TE. Formation of a complex of the catalytic subunit of pyruvate dehydrogenase phosphatase isoform 1 (PDP1c) and the L2 domain forms a Ca²⁺-binding site and captures PDP1c as a monomer. *Biochemistry*. 2004 Nov 30;43(47):15073-85.
194. Piccinini M, Mostert M, Alberto G, Ramondetti C, Novi RF, Dalmaso P, et al. Down-regulation of pyruvate dehydrogenase phosphatase in obese subjects is a defect that signals insulin resistance. *Obes Res*. 2005 Apr;13(4):678-86.
195. Caruso M, Maitan MA, Bifulco G, Miele C, Vigliotta G, Oriente F, et al. Activation and mitochondrial translocation of protein kinase Cdelta are necessary for insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in muscle and liver cells. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):45088-97.
196. Johnson SA, Denton RM. Insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase in adipocytes involves two distinct signalling pathways. *The Biochemical journal*. 2003 Jan 15;369(Pt 2):351-6.
197. Shan C, Kang HB, Elf S, Xie J, Gu TL, Aguiar M, et al. Tyr-94 phosphorylation inhibits pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 and promotes tumor growth. *J Biol Chem*. 2014 Aug 1;289(31):21413-22.
198. Fan J, Shan C, Kang HB, Elf S, Xie J, Tucker M, et al. Tyr phosphorylation of PDP1 toggles recruitment between ACAT1 and SIRT3 to regulate the pyruvate dehydrogenase complex. *Molecular cell*. 2014 Feb 20;53(4):534-48.
199. Maj MC, MacKay N, Levandovskiy V, Addis J, Baumgartner ER, Baumgartner MR, et al. Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: identification of the first mutation in two brothers and restoration of activity by protein complementation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jul;90(7):4101-7.
200. Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *The Biochemical journal*. 1998 Jan 1;329 (Pt 1):191-6.
201. Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, Popov KM. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *The Biochemical journal*. 2001 Aug 15;358(Pt 1):69-77.
202. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer cell*. 2007 Jan;11(1):37-51.
203. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med*. 2010 May 12;2(31):31ra4.
204. Hitosugi T, Fan J, Chung TW, Lythgoe K, Wang X, Xie J, et al. Tyrosine phosphorylation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase 1 is important for cancer metabolism. *Molecular cell*. 2011 Dec 23;44(6):864-77.
205. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006 Mar;3(3):177-85.

206. Golias T, Papandreou I, Sun R, Kumar B, Brown NV, Swanson BJ, et al. Hypoxic repression of pyruvate dehydrogenase activity is necessary for metabolic reprogramming and growth of model tumours. *Sci Rep*. 2016 Aug 8;6:31146.
207. Sutendra G, Kinnaird A, Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, Haromy A, et al. A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of acetyl-CoA and histone acetylation. *Cell*. 2014 Jul 3;158(1):84-97.
208. Schito L, Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer*. 2016 Dec;2(12):758-70.
209. Mekhail K, Gunaratnam L, Bonicalzi ME, Lee S. HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nat Cell Biol*. 2004 Jul;6(7):642-7.
210. Filatova A, Seidel S, Bogurcu N, Graf S, Garvalov BK, Acker T. Acidosis Acts through HSP90 in a PHD/VHL-Independent Manner to Promote HIF Function and Stem Cell Maintenance in Glioma. *Cancer Res*. 2016 Oct 1;76(19):5845-56.
211. Semenza GL. Advances in cancer biology and therapy. *J Mol Med (Berl)*. 2013 Apr;91(4):409.
212. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of clinical investigation*. 2013 Sep;123(9):3664-71.
213. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999 May 20;399(6733):271-5.
214. Pollard PJ, Briere JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC, et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet*. 2005 Aug 1;14(15):2231-9.
215. Briere JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P. Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Dec;291(6):C1114-20.
216. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*. 2000 Mar 15;60(6):1541-5.
217. Lee BL, Kim WH, Jung J, Cho SJ, Park JW, Kim J, et al. A hypoxia-independent up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 by AKT contributes to angiogenesis in human gastric cancer. *Carcinogenesis*. 2008 Jan;29(1):44-51.
218. Karni R, Dor Y, Keshet E, Meyuhas O, Levitzki A. Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha expression under normoxia. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):42919-25.
219. Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer metastasis reviews*. 2000;19(1-2):139-45.
220. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes & development*. 2000 Feb 15;14(4):391-6.
221. Bardos JJ, Ashcroft M. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2004 Mar;26(3):262-9.
222. Poon E, Harris AL, Ashcroft M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Rev Mol Med*. 2009 Aug 27;11:e26.
223. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res*. 2010 May 1;86(2):236-42.

224. Maxwell PH. The HIF pathway in cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 16. 2005:523-30.
225. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):187-97.
226. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell.* 2007 Apr 6;129(1):111-22.
227. Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, Vazquez S, et al. Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS One.* 2010 Mar 12;5(3):e9644.
228. Favaro E, Bensaad K, Chong MG, Tennant DA, Ferguson DJ, Snell C, et al. Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells. *Cell Metab.* 2012 Dec 5;16(6):751-64.
229. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med.* 2010 Apr;14(4):771-94.
230. Annibaldi A, Widmann C. Glucose metabolism in cancer cells. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010 Jul;13(4):466-70.
231. Bensaad K, Harris AL. Hypoxia and metabolism in cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;772:1-39.
232. Bensaad K, Favaro E, Lewis CA, Peck B, Lord S, Collins JM, et al. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Rep.* 2014 Oct 9;9(1):349-65.
233. Zaidi N, Lupien L, Kuemmerle NB, Kinlaw WB, Swinnen JV, Smans K. Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2013 Oct;52(4):585-9.
234. Huang, Li T, Li X, Zhang L, Sun L, He X, et al. HIF-1-mediated suppression of acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid oxidation is critical for cancer progression. *Cell Rep.* 2014 Sep 25;8(6):1930-42.
235. Yoo W, Noh KH, Ahn JH, Yu JH, Seo JA, Kim SG, et al. HIF-1 α expression as a protective strategy of HepG2 cells against fatty acid-induced toxicity. *J Cell Biochem.* 2014 Jun;115(6):1147-58.
236. Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniossoglou S, Simos G. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J Cell Sci.* 2012 Jul 15;125(Pt 14):3485-93.
237. Triantafyllou EA, Georgatsou E, Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. Expression of AGPAT2, an enzyme involved in the glycerophospholipid/triacylglycerol biosynthesis pathway, is directly regulated by HIF-1 and promotes survival and etoposide resistance of cancer cells under hypoxia. *Biochimica et biophysica acta.* 2018 Jun 15.
238. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Jun;10(6):417-27.
239. Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011 Sep 27;108(39):16369-74.
240. Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis. *Science (New York, NY).* 2016 Apr 8;352(6282):175-80.
241. Gilkes DM, Chaturvedi P, Bajpai S, Wong CC, Wei H, Pitcairn S, et al. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2013 Jun 1;73(11):3285-96.

242. Gilkes DM, Bajpai S, Wong CC, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D, et al. Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis. *Molecular cancer research : MCR*. 2013 May;11(5):456-66.
243. Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2013 Apr 12;288(15):10819-29.
244. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res*. 2011 Jul 1;71(13):4640-52.
245. Zhang M, Qiu Q, Li Z, Sachdeva M, Min H, Cardona DM, et al. HIF-1 Alpha Regulates the Response of Primary Sarcomas to Radiation Therapy through a Cell Autonomous Mechanism. *Radiat Res*. 2015 Jun;183(6):594-609.
246. Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat*. 2011 Jun;14(3):191-201.
247. Samanta D, Gilkes DM, Chaturvedi P, Xiang L, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014 Dec 16;111(50):E5429-38.
248. Lu H, Samanta D, Xiang L, Zhang H, Hu H, Chen I, et al. Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015 Aug 18;112(33):E4600-9.
249. Rey S, Schito L, Wouters BG, Eliasof S, Kerbel RS. Targeting Hypoxia-Inducible Factors for Antiangiogenic Cancer Therapy. *Trends Cancer*. 2017 Jul;3(7):529-41.
250. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010 Feb 4;29(5):625-34.
251. Bastien L, Culine S, Paule B, Ledbai S, Patard JJ, de la Taille A. Targeted therapies in metastatic renal cancer in 2009. *BJU Int*. 2009 May;103(10):1334-42.
252. Chen W, Hill H, Christie A, Kim MS, Holloman E, Pavia-Jimenez A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature*. 2016 Nov 3;539(7627):112-7.
253. Cho H, Du X, Rizzi JP, Liberzon E, Chakraborty AA, Gao W, et al. On-target efficacy of a HIF-2alpha antagonist in preclinical kidney cancer models. *Nature*. 2016 Nov 3;539(7627):107-11.
254. Eltzschig HK, Bratton DL, Colgan SP. Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 Nov;13(11):852-69.
255. Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther*. 2001 Apr;8(8):638-45.
256. Chen J, Zhao S, Nakada K, Kuge Y, Tamaki N, Okada F, et al. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. *Am J Pathol*. 2003 Apr;162(4):1283-91.
257. Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, et al. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer cell*. 2004 Jul;6(1):33-43.
258. Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Livingston DM. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med*. 2000 Dec;6(12):1335-40.
259. Yeo EJ, Chun YS, Park JW. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol*. 2004 Sep 15;68(6):1061-9.

260. Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, et al. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Apr 2;95(7):516-25.
261. Li SH, Shin DH, Chun YS, Lee MK, Kim MS, Park JW. A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1{alpha}. *Mol Cancer Ther.* 2008 Dec;7(12):3729-38.
262. Park EJ, Kong D, Fisher R, Cardellina J, Shoemaker RH, Melillo G. Targeting the PAS-A domain of HIF-1alpha for development of small molecule inhibitors of HIF-1. *Cell cycle (Georgetown, Tex).* 2006 Aug;5(16):1847-53.
263. Lee K, Zhang H, Qian DZ, Rey S, Liu JO, Semenza GL. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009 Oct 20;106(42):17910-5.
264. Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res.* 2005 Oct 1;65(19):9047-55.
265. Choi HJ, Song BJ, Gong YD, Gwak WJ, Soh Y. Rapid degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha by KRH102053, a new activator of prolyl hydroxylase 2. *Br J Pharmacol.* 2008 May;154(1):114-25.
266. Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoulmik A, et al. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell.* 2004 Jun 25;117(7):941-52.
267. Moller A, House CM, Wong CS, Scanlon DB, Liu MC, Ronai Z, et al. Inhibition of Siah ubiquitin ligase function. *Oncogene.* 2009 Jan 15;28(2):289-96.
268. Tan C, de Noronha RG, Roecker AJ, Pyrzynska B, Khwaja F, Zhang Z, et al. Identification of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. *Cancer Res.* 2005 Jan 15;65(2):605-12.
269. Yang J, Ahmed A, Poon E, Perusinghe N, de Haven Brandon A, Box G, et al. Small-molecule activation of p53 blocks hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in vivo and leads to tumor cell apoptosis in normoxia and hypoxia. *Molecular and Cellular Biology.* 2009 Apr;29(8):2243-53.
270. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Molecular and Cellular Biology.* 2002 Oct;22(20):7004-14.
271. Miranda E, Nordgren IK, Male AL, Lawrence CE, Hoakwie F, Cuda F, et al. A cyclic peptide inhibitor of HIF-1 heterodimerization that inhibits hypoxia signaling in cancer cells. *J Am Chem Soc.* 2013 Jul 17;135(28):10418-25.
272. Wang Y, Thompson JD, Chan WK. A cell-penetrating peptide suppresses the hypoxia inducible factor-1 function by binding to the helix-loop-helix domain of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Chem Biol Interact.* 2013 Apr 25;203(2):401-11.
273. Rizzuti M, Nizzardo M, Zanetta C, Ramirez A, Corti S. Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discov Today.* 2015 Jan;20(1):76-85.
274. Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS letters.* 2013 Jun 19;587(12):1693-702.
275. Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R, Brock R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic.* 2007 Jul;8(7):848-66.
276. Ziegler A, Seelig J. Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters. *Biophys J.* 2004 Jan;86(1 Pt 1):254-63.

277. Nakase I, Tadokoro A, Kawabata N, Takeuchi T, Katoh H, Hiramoto K, et al. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry*. 2007 Jan 16;46(2):492-501.
278. Kauffman WB, Fuselier T, He J, Wimley WC. Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends Biochem Sci*. 2015 Dec;40(12):749-64.
279. Futaki S, Nakase I, Tadokoro A, Takeuchi T, Jones AT. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem Soc Trans*. 2007 Aug;35(Pt 4):784-7.
280. Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Research*. 1991 May 11;19(9):2499.
281. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*. 1985 Mar;100(3):965-73.
282. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
283. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329-33.
284. Rafehi H, Orlowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp*. 2011 Mar 13(49).
285. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516.
286. Κούρτη Μ. Μελέτη της ρύθμισης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α μέσω φωσφορύλιωσης και του ρόλου του στον κυτταρικό μεταβολισμό. . Διδακτορική διατριβή. 2016.
287. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cells*. 2010 May;29(5):435-42.
288. Cangul H. Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. *BMC Genet*. 2004 Sep 2;5:27.
289. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012 Feb 3;148(3):399-408.
290. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*. 2000 Oct;80(4):1483-521.
291. Eschricht S, Jarr KU, Kuhn C, Lehmann L, Kreusser M, Katus HA, et al. Heat-shock-protein 90 protects from downregulation of HIF-1alpha in calcineurin-induced myocardial hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Aug;85:117-26.
292. Wang K, Song Y, Chen DB, Zheng J. Protein phosphatase 3 differentially modulates vascular endothelial growth factor- and fibroblast growth factor 2-stimulated cell proliferation and signaling in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod*. 2008 Oct;79(4):704-10.
293. Chowdhury AR, Long A, Fuchs SY, Rustgi A, Avadhani NG. Mitochondrial stress-induced p53 attenuates HIF-1alpha activity by physical association and enhanced ubiquitination. *Oncogene*. 2017 Jan 19;36(3):397-409.
294. Li N, Zhang Z, Zhang W, Wei Q. Calcineurin B subunit interacts with proteasome subunit alpha type 7 and represses hypoxia-inducible factor-1alpha activity via the proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Feb 18;405(3):468-72.
295. Seta KA, Yuan Y, Spicer Z, Lu G, Bedard J, Ferguson TK, et al. The role of calcium in hypoxia-induced signal transduction and gene expression. *Cell Calcium*. 2004 Sep-Oct;36(3-4):331-40.

296. Bosser R, Aligue R, Guerini D, Agell N, Carafoli E, Bachs O. Calmodulin can modulate protein phosphorylation in rat liver cells nuclei. *J Biol Chem.* 1993 Jul 25;268(21):15477-83.
297. Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature.* 1996 Jul 25;382(6589):370-3.
298. McFate T, Mohyeldin A, Lu H, Thakar J, Henriques J, Halim ND, et al. Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J Biol Chem.* 2008 Aug 15;283(33):22700-8.
299. Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, et al. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008 Dec 16;105(50):19579-86.
300. Fry DC, Vassilev LT. Targeting protein-protein interactions for cancer therapy. *J Mol Med (Berl).* 2005 Dec;83(12):955-63.
301. Berg T. Inhibition of transcription factors with small organic molecules. *Curr Opin Chem Biol.* 2008 Aug;12(4):464-71.
302. Yano K, Horinaka M, Yoshida T, Yasuda T, Taniguchi H, Goda AE, et al. Chetomin induces degradation of XIAP and enhances TRAIL sensitivity in urogenital cancer cells. *Int J Oncol.* 2011 Feb;38(2):365-74.
303. Singh V, Nand A, Chen C, Li Z, Li SJ, Wang S, et al. Echinomycin, a potential binder of FKBP12, shows minor effect on calcineurin activity. *J Biomol Screen.* 2014 Oct;19(9):1275-81.
304. Wang X, Qiao Y, Asangani IA, Ateeq B, Poliakov A, Cieslik M, et al. Development of Peptidomimetic Inhibitors of the ERG Gene Fusion Product in Prostate Cancer. *Cancer cell.* 2017 Apr 10;31(4):532-48 e7.
305. Johnson RM, Harrison SD, Maclean D. Therapeutic applications of cell-penetrating peptides. *Methods Mol Biol.* 2011;683:535-51.
306. Hubbi ME, Kshitiz, Gilkes DM, Rey S, Wong CC, Luo W, et al. A nontranscriptional role for HIF-1alpha as a direct inhibitor of DNA replication. *Sci Signal.* 2013 Feb 12;6(262):ra10.
307. Zheng X, Ruas JL, Cao R, Salomons FA, Cao Y, Poellinger L, et al. Cell-type-specific regulation of degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha: role of subcellular compartmentalization. *Molecular and Cellular Biology.* 2006 Jun;26(12):4628-41.
308. Willam C, Masson N, Tian YM, Mahmood SA, Wilson MI, Bicknell R, et al. Peptide blockade of HIFalpha degradation modulates cellular metabolism and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002 Aug 6;99(16):10423-8.

HIF-1 α -derived cell-penetrating peptides inhibit ERK-dependent activation of HIF-1 and trigger apoptosis of cancer cells under hypoxia

**Angeliki Karagiota, Maria Kourti,
George Simos & Ilias Mylonis**

Cellular and Molecular Life Sciences

ISSN 1420-682X

Volume 76

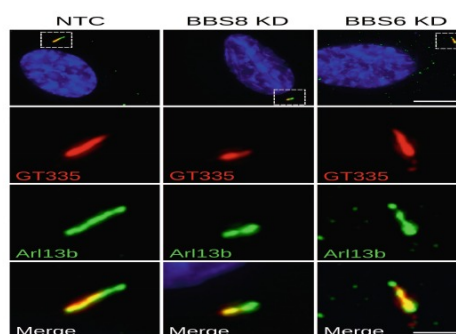
Number 4

Cell. Mol. Life Sci. (2019) 76:809–825

DOI 10.1007/s00018-018-2985-7

Cellular and
Molecular
Life Sciences

Cell. Mol. Life Sci.
Volume 76
No. 4, 2019
Pages 827 – 826
February 2019, 2nd issue
ISSN 1420-682X



Springer

Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Nature Switzerland AG. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



HIF-1 α -derived cell-penetrating peptides inhibit ERK-dependent activation of HIF-1 and trigger apoptosis of cancer cells under hypoxia

Angeliki Karagiota¹ · Maria Kourti¹ · George Simos^{1,2} · Ilias Mylonis¹

Received: 24 August 2018 / Revised: 19 November 2018 / Accepted: 27 November 2018 / Published online: 10 December 2018
 © Springer Nature Switzerland AG 2018

Abstract

Hypoxia is frequently encountered in the microenvironment of solid tumors. Hypoxia-inducible factors (HIFs), the main effectors of cell response to hypoxia, promote cancer cell survival and progression. HIF-1 α , the oxygen-regulated subunit of HIF-1, is often correlated with oncogenesis and represents an attractive therapeutic target. We have previously reported that activation HIF-1 α by ERK involves modification of two serine residues and masking of a nuclear export signal (NES), all inside a 43-amino acid domain termed ERK Targeted Domain (ETD). Overexpression of ETD variants including wild-type, phospho-mimetic (SE) or NES-less (IA) mutant forms caused HIF-1 inactivation in two hepatocarcinoma cell lines, while a phospho-deficient (SA) form was ineffective and acted as a sequence-specific negative control. To deliver these ETD forms directly into cancer cells, they were fused to the HIV TAT-sequence and produced as cell-permeable peptides. When the TAT-ETD peptides were added to the culture medium of Huh7 cells, they entered the cells and, with the exception of ETD-SA, accumulated inside the nucleus, caused mislocalization of endogenous HIF-1 α to the cytoplasm, significant reduction of HIF-1 activity and inhibition of expression of specific HIF-1, but not HIF-2, gene targets under hypoxia. More importantly, transduced nuclear TAT-ETD peptides restricted migration, impaired colony formation and triggered apoptotic cell death of cancer cells grown under hypoxia, while they produced no effects in normoxic cells. These data demonstrate the importance of ERK-mediated activation of HIF-1 for low oxygen adaptation and the applicability of ETD peptide derivatives as sequence-specific HIF-1 and cancer cell growth inhibitors under hypoxia.

Keywords Hypoxia · Cancer · Cell-penetrating peptides · HIF-1 · ERK1/2

Introduction

The development of permanent or transient hypoxic regions is a common aspect of solid tumors due to an occurring imbalance between oxygen availability and consumption in highly proliferating cancer cells [1].

Adaptation of cancer cells to oxygen deprivation depends on activation of hypoxia-inducible factors (HIFs), which stimulate tumor angiogenesis and mediate metabolic reprogramming of cancer cells, thus, facilitating their proliferation, migration, metastasis and resistance to conventional therapies [2]. HIFs act as heterodimers and comprise HIF- α subunits regulated by oxygen and a constitutively expressed HIF- β subunit (or ARNT; Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). HIF-1 α , the most studied and broadly expressed HIF- α isoform, is constantly produced but under normal oxygen tension is hydroxylated by oxygen-dependent prolyl-hydroxylases, subjected to polyubiquitination by a pVHL-containing E3 ligase complex and degraded at the proteasome [3]. HIF-1 α comprises distinct functional domains such as basic helix-loop-helix (bHLH) and PER-ARNT-SIM (PAS) domains in its N-terminus that mediate attachment to DNA and heterodimerization with ARNT, respectively. In addition, HIF-1 α contains an oxygen-dependent degradation (ODD) domain

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2985-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ George Simos
simos@med.uth.gr

✉ Ilias Mylonis
mylonis@med.uth.gr

¹ Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Biopolis, 41500 Larissa, Greece

² Gerald Bronfman Department of Oncology, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Canada

and two transactivation domains (N-TAD and C-TAD) that associate with transcription co-activators like p300/CBP. TADs are separated by a spacer region termed inhibitory domain (ID), upon the deletion of which TAD-mediated transactivation is increased [4]. HIF-1 α is overexpressed in cancer cells due to local hypoxia, oncogenic transformation (e.g., VHL mutations that trigger HIF-1 α stabilization and cause renal carcinoma and hemangioblastoma) or overactivation of signaling pathways that cause HIF-1 α activation resulting in increased survival of cancer cells [5]. Thus, HIF-1 α overexpression is observed in many cancer types and associated with malignant phenotype and increased patient mortality. Therefore, HIF-1 α has become an attractive target for anticancer treatment [6]. Preclinical studies have shown that HIF-1 α inhibition may have therapeutic utility, especially in combination with traditional chemical or radiation treatments [7]. Moreover, validation of HIF- α as targets for anticancer therapy is supported by a recent study that describes the trial of a prototype compound that targets HIF-2 α /ARNT dimerization in a patient suffering from metastatic renal carcinoma (ccRCC) with promising results [8]. Targeting of HIF-1 is also important for treating diseases other than cancer such as pulmonary arterial hypertension, non-alcoholic fatty liver disease, ocular neovascularization and others, the pathogenicity of which involves maladaptive overactivation of HIF-1 [9].

In addition to oxygen levels, HIF-1 α regulation involves oxygen-independent mechanisms that involve oncogenic signaling, protein interactions and HIF-1 α post-translational modifications [10]. Direct phosphorylation, the most studied HIF-1 α modification, by kinases such as GSK3, PLK3, CDK1 and ATM affects HIF-1 α stabilization [11], whereas modifications by CK1 δ affects its dimerization with ARNT [12]. However, a phosphorylation that directly modulates HIF-1 α transcriptional activity is mediated by ERK1/2. In our previous studies, we have shown that HIF-1 α is modified by ERKs on Ser residues 641 and 643 that reside inside a small domain termed ETD (ERK Targeted Domain; amino acids 616–658). This phosphorylation inhibits HIF-1 α export from nucleus as it impairs HIF-1 α interaction with CRM1 that can bind to a neighboring nuclear export signal (NES) [13, 14]. Thus, HIF-1 α phosphorylation by ERKs guarantees its effective nuclear accumulation and full transcriptional activation of its target genes. Indeed, overexpression of the ETD (containing both the ERK-modified sites and NES signal) as an independent peptide in its wild-type form competed with endogenous HIF-1 α and inhibited its activity in HeLa and Huh7 cells, whereas a mutant form that could not be phosphorylated by ERKs left HIF-1 activity unaffected [14, 15]. Furthermore, inactivation of ERKs via MEK inhibitors, natural compounds or serum starvation also caused translocation of HIF-1 α to the cytoplasm and loss of its transcriptional activity [16, 17].

Blocking of HIF-1 phosphorylation by kinase inhibitors is an efficient, but not specific way to impair the transcriptional response to hypoxia. On the other hand, overexpression of substrate-derived phosphorylation-competing peptides by plasmid transfection is a specific but not very efficient or practical method, especially when intended for therapeutic purposes. A promising approach for delivery of inhibitory peptides into cells is their conjugation with short cell-permeable amino acid sequences derived from proteins able to traverse biological membranes. The best example is the transactivator of transcription (or TAT) peptide of HIV-1, one of the most studied cell-penetrating peptides [18].

In this work, we demonstrate that HIF-1 α -derived ETD peptide variants fused to the TAT sequence effectively enter into cancer cells, specifically target ERK1/2-mediated HIF-1 α activation and significantly inhibit biological functions crucial for cancer cell propagation and survival under low oxygen conditions. These cell-penetrating peptides will be very useful as research tools for studying hypoxia-mediated responses and may ultimately be used for developing viable therapeutic approaches for cancer or other HIF-1-implicating disorders.

Methods

Plasmid constructions

Flag-tagged ETD expression plasmids for wild-type (wt) and SA (Ser641Ala, Ser643Ala) forms have been previously described [14]. To construct Flag-ETD-SE (Ser641Glu) and -IA (Ile637Ala, Leu638Ala, Ile639Ala), the respective cDNA fragments were subcloned as BamHI inserts into pFLAG-CMV2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vector after digesting with BamHI the previously reported pEGFP-C1-ETD-SE and pGEX-4T-1-ETD-IA plasmids, respectively [14]. Construction of pTRE-Tight-FLAG-ETD plasmids expressing for wt, SA, SE and IA forms entailed the isolation of the FLAG-ETD cDNA fragment from the corresponding pFLAG-CMV2-ETD plasmids, after digesting each plasmid with the SacI restriction enzyme, followed by incubation with T4 DNA Polymerase and dNTPs to create blunt ends. The empty pTRE-Tight vector (Clontech, Fremont, CA, USA) was digested with the restriction enzyme PvuII, to generate blunt ends, followed by ligase reaction with the Flag-ETD cDNAs. Bacterial expression plasmids expressing for GST-TAT-ETD-Flag wt, SA, SE and IA peptide forms were produced by PCR, using as template previously shown pEGFP-C1-HIF-1 α plasmids expressing full length HIF-1 α forms (wt, SA, SE and IA), respectively [14]. The PCR primer for sense strand also contained the sequence that encodes for the HIV TAT peptide, while the PCR primer for anti-sense strand also contained the

sequence that encodes for the Flag-tag peptide, so that the different ETDs may be produced as TAT-ETD-Flag peptides. Primer sequences are shown in Table S2. The cDNAs of the TAT-ETD-Flag forms were cloned as BamHI fragments into pGEX-4T-1 bacterial expression vector (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The DNA sequences of all ETD forms were confirmed by sequencing performed by VbC-Biotech (Vienna, Austria).

Protein expression and purification

Plasmids encoding for wild-type and mutant forms of GST-TAT-ETD-Flag peptides were transformed into the BL21RIL *E. coli* strain. Expression of recombinant proteins was induced by adding 0.5 mM IPTG into LB broth culture medium, which also contained 1% sorbitol and 50 mM phosphate buffer, pH 7, for 1 h at 25 °C. *E. coli* cells expressing GST-fusion peptides were lysed by sonication in a buffer containing 20 mM Tris-HCl 7.6, 137 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0.1% Tween 20 and 1 mM DTT. The soluble extracts were incubated with Protino® Glutathione Agarose 4B (Macherey-Nagel, Duren, Germany) suspension for 1 h and washed three times with lysis buffer. TAT-ETD-Flag peptides were cleaved from GST bound on agarose-GSH resin and eluted by applying 1 ml of TEV protease elution buffer (5 μ g of purified His-TEV protease diluted in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 0.5 mM EDTA). Purified His-TEV protease was obtained as described in Cabrita et al. [19]. Eluates containing His-TEV protease (~28 kDa) and TAT-ETD-Flag peptide forms (Table S1) were passed through a Microcon-10 kDa centrifugal filter supplied with Ultracel-10 membrane spin filter column with 10 kDa cutoff. TAT-ETD-Flag peptides were collected at the flow-through, whereas TEV protease remained in the concentrate.

Cell culture, transfection and reporter gene assay

Human Huh7, HeLa or HepG2 cells acquired from ATCC or tTA-HepG2 cells (generous gift of Prof. K. Pantopoulos, [20]) were regularly examined for mycoplasma and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Biosera, Nuaille, France) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Biochrom, Berlin, Germany). Transient transfections were carried out as previously described in 24-well plates by using Turbofect™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) transfection reagent [13]. For inducible expression experiments, cell transfection with the pTRE-Tight-FLAG-ETD plasmids was followed by culturing cells in the absence or presence of 1 μ g/ml Dox for 48 h at 37 °C. Dox was added to the culture medium to suppress the expression of Flag-ETDs, while their induction was possible when the antibiotic was absent. Reporter gene assays were performed as previously

described [13] and luciferase activity was determined by using 'Dual-Luciferase Reporter Assay System' (Promega, Madison, WI, USA). Peptide treatments were performed by adding into culture medium 3 μ g/ml of the TAT-ETD-Flag peptides (~380 nM, see also Table S1) and cells were pre-incubated for 1 h under normoxia (21% O₂) to transduce peptides, followed by incubation under normoxic (21% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions as required. For cell treatment spanning more than 24 h, the culture medium was replenished with the cell-penetrating peptides every 24 h. Hypoxic conditions were achieved by exposing cells to 1% O₂, 94% N₂ and 5% CO₂ in an IN VIVO2 200 hypoxia workstation (Baker Ruskinn, Sanford, Maine, USA).

Cell fractionation

Biochemical fractionation of cells was performed as described in [21]. Briefly, Huh7 cells were washed twice with cold PBS, detached by trypsinization and collected by centrifugation at 100 \times g at 4 °C. Pelleted cells were suspended in 400 μ l of hypotonic buffer (10 mM Hepes-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol and 0.2 mM PMSF) and allowed to swell for 20 min on ice. Cytoplasmic proteins were collected in the supernatant by centrifugation at 2000 \times g (4 °C). The nuclear pellet was resuspended in 400 μ l of hypertonic buffer (20 mM Hepes-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol and 0.2 mM PMSF) and, after 20 min incubation on ice, soluble nuclear proteins were collected in the supernatant by centrifugation at 10,000 \times g (4 °C).

SDS-PAGE and western blotting

Recombinant proteins or lysates (approximately, 60 μ g of total protein extracts) were resolved by 10%–15% SDS-PAGE gels, and either stained by Coomassie Brilliant Blue or analyzed by immunoblotting performed as previously described [13]. Antibodies used are: affinity purified rabbit anti-HIF-1 α polyclonal antibody (pAb) (1:1000; [22]), anti-HIF-2 α rabbit pAb (NB100-122, 1:1000 dilution) from Novus Europe (Cambridge, UK), anti-VEGF rabbit pAb (sc152, 1:1000) from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), anti-Flag mouse monoclonal antibody (mAb) (F4042, 1:10000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), anti-beta actin mouse mAb (3700; 1:5000), anti-caspase 3 rabbit pAb (9662; 1:1000), anti-cleaved caspase 3 rabbit pAb (9664; 1:1000), anti-ERK1/2 rabbit pAb (9102; 1:1000), anti-phospho-ERK1/2 rabbit pAb (9101; 1:1000) purchased by Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Western blot images were collected by using Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System supplied with Alliance Software (ver. 16.06) and quantified by Uviband Software

(ver. 15.03) supplied by the instrument manufacturer (Uvitec Cambridge).

Immunofluorescence microscopy

Immunofluorescence microscopy experiments were performed as previously described [14]. In brief, cells were grown on coverslips and fixed with 3% formaldehyde in PBS for 5 min, permeabilized with 0.1% Triton-X 100 at 4 °C for 15 min, and treated with 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature. Then, coverslips were incubated overnight at 4 °C with a rabbit polyclonal anti-HIF-1 antibody (1:1000 in blocking buffer; [22]) and a mouse monoclonal anti-Flag antibody (F4042, 1:1000 in blocking buffer; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), washed twice with PBS, and incubated for 30 min at room temperature with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse and Cy3-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK). Cells were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), mounted on slides, and visualized with a Zeiss Axio Imager.Z2 microscope equipped with AxioCam MRm sensor and a 40× objective or 100× oil-immersion lens. Lipid droplet staining was achieved by using Nile Red (0.1 mg in PBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 15 min after standard immunofluorescence microscopy procedure and before mounting on slides [23].

RNA extraction and real-time quantitative PCR

Total RNA from Huh7, HeLa or HepG2 cells was isolated by using NucleoZol reagent (Macherey–Nagel, Duren, Germany) and cDNA was synthesized with the High Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time quantitative PCR was performed with KAPA SYBR FAST qPCR (Kapa Biosystems, Wilmington, MA USA) in a LightCycler® 96 System (Roche, Basel, Switzerland). The mRNAs encoding for *VEGF*, *LIPIN1*, *P4HA1*, *NDRG1*, *PAI-1*, *FSP1* and *ACTIN* were amplified using primers shown in Table S2. Each sample was assayed in triplicate for all targets and internal control. Relative quantitative gene expression was calculated using the $\Delta\Delta CT$ method and presented as a fold increase in relation to the respective control.

Wound-healing assay

Wound-healing assay was performed according to Liang et al. [24]. Briefly, Huh7 cells were plated into six-well culture dishes and grown to create a confluent monolayer. The monolayer was grazed in a straight line to create a “scratch” with a pipette tip. Markings were created close to the scratch to be used as reference points. The cellular debris were

washed away with PBS and then cells were supplied with DMEM containing 1% FBS and antibiotics. Then, cells were treated with 3 µg/ml of TAT-ETD-Flag peptide forms every 24 h and left to migrate inside the empty surface for 48 h under normoxia or hypoxia. Images were collected with a Leica DFC480 camera (LAS software version V2.3.1.R1) on a phase-contrast microscope equipped with a 20× objective at room temperature at each time point. The polygon selection tool of ImageJ software (v.1.51 g, NIH) was used to measure the free area of the wound.

Clonogenic assay

Huh7 cells were seeded into 60 mm culture dishes at a density of 6000 cells/plate and treated with 3 µg/ml of the TAT-ETD-Flag peptide forms replenished every 24 h and for 7 days, under normoxia or hypoxia. Cells were left to grow into colonies, washed with PBS, fixed with ice-cold 100% methanol and stained with 0.5% crystal violet solution in 25% methanol. Pictures were collected by each dish and ImageJ software (v.1.51 g, NIH) was used to measure the number of colonies by using the ‘Find Maxima’ command [25].

Cell proliferation and cell death assays

For cell proliferation (Huh7 cell line) and death assays in Huh7, HeLa or HepG2 lines, cells were seeded into 96-well plates (1000 or 2000 cells/well, respectively) and treated with 3 µg/ml of TAT-ETD-FLAG peptides restocked every 24 h and for the indicated periods under normoxia or hypoxia. Cell proliferation was measured using the ‘CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay’ kit (Promega, Madison, WI, USA) and values were normalized to those in the absence of cells for each condition. Determination of cell death involved cells cultured in DMEM supplied with 1% FBS and was performed by using the ‘LDH Cytotoxicity Detection kit’ (Takara-Clontech, Mountain View, CA, USA).

TUNEL and Annexin V assays

For both TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) and Annexin V assays, Huh7 cells were seeded on coverslips and treated for 48 h with 3 µg/ml of TAT-ETD-FLAG peptides replenished every 24 h under normoxia or hypoxia. Apoptotic DNA fragmentation and phosphatidylserine translocation were monitored by using the ‘In situ Apoptosis Detection’ kit (Takara-Clontech, Mountain View, CA, USA) and the ‘CF555 Annexin V and PI Apoptosis Assay’ kit (Biotium, Fremont, CA, USA), respectively. After fluorescent staining was established, nuclei were stained with DAPI and pictures were collected

with a Zeiss Axio Imager.Z2 microscope equipped with AxioCam MRm sensor and 20x objective.

Quantification of fluorescence and statistical analysis

Quantitation of the fluorescence emitted by Nile Red was performed using the ImageJ public domain software (v.1.51 g, NIH) and expressed as fluorescence intensity [26] and involved outlining each cell, measuring area, fluorescence intensity and adjacent background and calculating total corrected cellular fluorescence as $TCCF = \text{integrated density} - (\text{area of selected cell} \times \text{mean fluorescence of background})$.

Statistical differences between two groups of data were evaluated by using the GraphPad Prism version 5.04 software. Differences were tested by Student's *t* test (two-tailed) between two groups or by one-way analysis of variance (ANOVA) within multiple groups; $P < 0.05$ was deemed statistically significant (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Results

Overexpression of HIF-1 α -derived ETD peptides mislocalize and inactivate endogenous HIF-1 α in human Huh7 and HepG2 cancer cells

We have previously shown that overexpression of the wild-type (wt) form of Flag-tagged ETD (Fig. 1a) in HeLa or Huh7 cells caused reduction of HIF transcriptional activity, in contrast to its phosphorylation-deficient mutant form ETD-SA (Fig. 1a) that was ineffective [14, 15]. To extend our study and search for more potent HIF-1 α inhibitors amongst ETD variants, previously reported ETD forms carrying either a phospho-mimetic mutation at position 641 (ETD-SE) or NES-debilitating mutations at positions 637, 638 and 639 (ETD-IA) (Fig. 1a) were Flag-tagged and tested for their effect on HIF-1 α localization and activity. Co-transfection of Huh7 cells with full length GFP-HIF-1 α under normoxia showed that Flag-ETD forms able to be phosphorylated by ERKs (ETD-wt and ETD-IA) or mimicking phosphorylation (ETD-SE) were predominantly nuclear and caused mislocalization of GFP-HIF-1 α to the cytoplasm, with the ETD-IA mutant exhibiting a stronger effect (Fig. 1b; white arrows). In contrast, the phosphorylation-deficient ETD-SA mutant was exclusively cytoplasmic and had no effect on GFP-HIF-1 α localization (Fig. 1b; white arrows). When Flag-ETD variants were expressed in Huh7 cells under hypoxia (1% O₂), they exhibited the same localization. Nuclear Flag-ETDs affected endogenous HIF-1 α by misplacing it from the nucleus (EDT-wt and EDT-SE) or depleting it (ETD-IA) (Fig. 1c; white arrows) and strongly

reduced HIF-1 transcriptional activity (Fig. 1d), while the cytoplasmic ETD-SA failed to affect HIF-1 α localization or HIF-1 activity (Fig. 1c, white arrows; Fig. 1d). These results were reproduced using a tetracycline-inducible expression system that allowed the controlled expression of Flag-ETD forms in HepG2 cells carrying the tetracycline-controlled transactivator (tTA-HepG2) (Fig. 1e, f). Removal of doxycycline (-dox) from the HepG2 cell medium under hypoxia triggered the expression of Flag-ETDs and produced similar effects on endogenous HIF-1 α subcellular distribution (Fig. 1e) and HIF-1 transcriptional activity (Fig. 1f) as the non-inducible overexpression of their counterparts in Huh7 cells.

Generation of cell-permeable HIF-1 α ETD-derived peptides

To better evaluate the potential of ETD variants as HIF-1 inhibitors that could be delivered directly into the cells, all the previously tested ETD forms were fused to the HIV TAT transduction sequence at their N-terminus, to become cell penetrating, and the Flag-epitope at their C-terminus, to be easily detectable. To produce and purify these cell-permeable peptides, their cDNAs were cloned into a bacterial expression vector encoding a TEV cleavage site after the GST encoding sequence (Fig. 2a). The peptide production process (depicted schematically in Fig. 2b) initially entailed bacterial expression and affinity purification of GST-TAT-ETD-Flag proteins (Fig. 2c). Next, the purified proteins were immobilized on GSH-beads and the TAT-ETD-Flag peptides were released by cleaving off GST using TEV protease (Fig. 2d). TEV protease (~28 kDa) was separated from the TAT-ETD-Flag peptides (approximately, 7 kDa; table S1) using ultrafiltration (Fig. 2d). SDS-PAGE analysis showed recovery of all TAT-ETD-Flag forms in pure form (Fig. 2e).

Nuclear cell-penetrating TAT-ETD peptides do not affect HIF-1 α protein levels, but impair selectively its nuclear accumulation and activity

Flag-tagged TAT-ETD peptides were, initially, tested for their ability to enter inside Huh7 cells and their effect on HIF-1 α protein levels. Both under normoxia or hypoxia, all TAT-ETD forms could be detected inside the cells 2 h post-transduction, their intracellular concentration was maximized at 4–8 h and they were still detectable 24 h after addition to the culture medium (Fig. 3a). At all time points tested under hypoxia, the induction of HIF-1 α was not significantly affected by the cellular entry of the TAT-ETD peptides (Fig. 3a). However, as shown by biochemical fractionation (Fig. 3b) and immunofluorescence microscopy analysis (Fig. 3c), the TAT-ETD-wt, -SE and -IA forms, which were themselves predominantly nuclear, caused the translocation

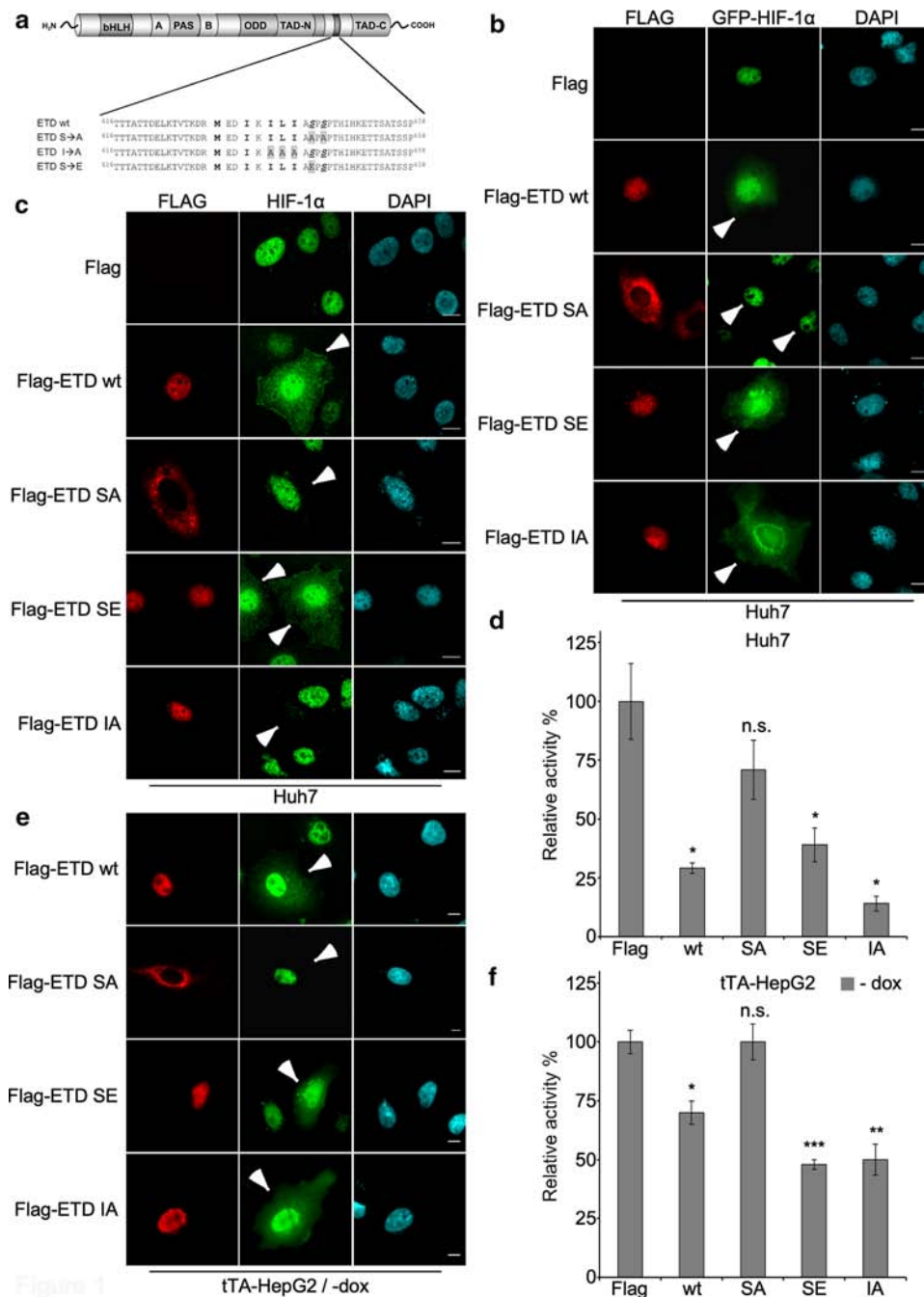


Fig. 1 Overexpressed Flag-ETD peptide forms impair nuclear accumulation and activity of HIF-1α in Huh7 and HepG2 cells. **a** Schematic representation of HIF-1α protein domains and amino acid sequence of wild-type and mutant forms of ETD. ERK-modified or NES-forming residues are underlined or in bold, respectively. Gray boxes indicate residues introduced by mutagenesis. **b** Immunofluorescence microscopy of Huh7 cells expressing Flag-tagged ETD peptides and GFP-HIF-1α (Scale=10 μm; arrows indicate transfected cells). **c** Immunofluorescence microscopy of Huh7 cells expressing Flag-tagged ETD peptides incubated under hypoxia for 4 h (scale=10 μm; arrows indicate transfected cells). **d** Huh7 cells transfected with Flag-tagged ETD expressing plasmids in various forms (as indicated) along with the pGL3-5HRE-VEGF and pCI-Renilla reporter plasmids. Values are ratios of firefly luciferase activity over Renilla activity expressed as percentage of fold increase in hypoxia relative to normoxia and represent the mean of three independent experiments performed in triplicate ± s.e.m. ($n=9$; $*P<0.05$). **e** Immunofluorescence microscopy of tTA-HepG2 cells expressing Flag-ETD peptides in the absence of doxycycline (-dox) for 44 h (Scale=10 μm; white arrows indicate transfected cells). **f** tTA-HepG2 cells transfected with pTRE-Tight-Flag-ETD plasmids in various forms (as indicated) along with the pGL3-5HRE-VEGF and pCI-Renilla reporter plasmids were grown for 32 h in the absence of doxycycline (-dox) and incubated in normoxia or hypoxia for 16 h. Values are ratios of firefly luciferase activity over Renilla activity expressed as percentage of fold increase in hypoxia relative to normoxia and represent the mean of three independent experiments performed in triplicate ± s.e.m. ($n=9$; ns non-significance, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ —compared to Flag control)

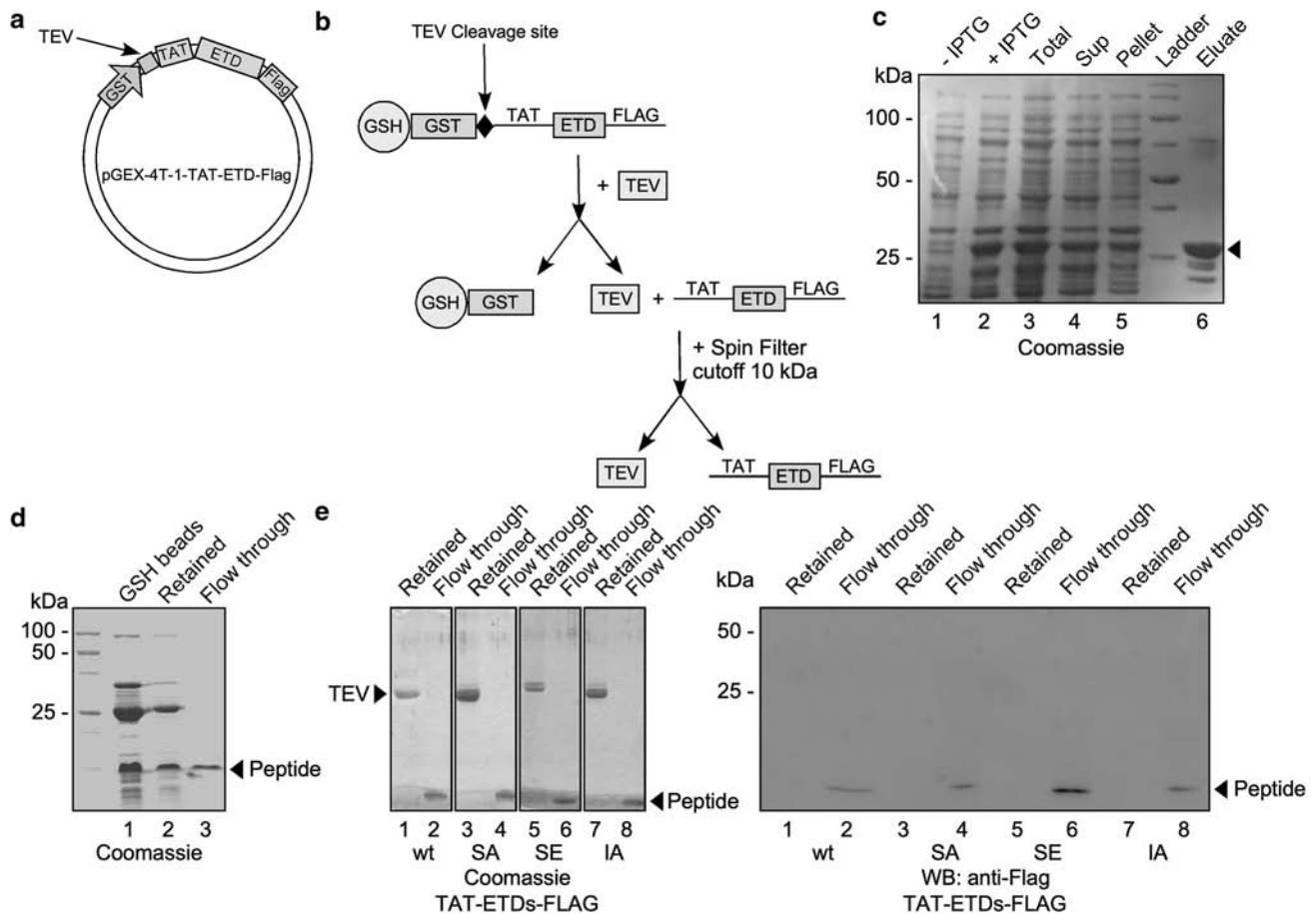


Fig. 2 Expression and purification of cell-permeable HIF-1 α -derived TAT-ETD-Flag peptides. **a** Depiction of the expression plasmid after cloning cDNAs encoding for the different TAT-ETD-Flag forms. **b** Workflow of purification by affinity chromatography of the different TAT-ETD-Flag forms. **c** Representative GST-TAT-ETD-Flag (for the wt form) protein expression. BL21RIL *E. coli* cells transformed with the pGEX-4T-1-TAT-ETD-Flag plasmid were incubated in the absence (–; lane 1) or presence (+; lane 2) of IPTG. Homogenate (lane 3), supernatant (lane 4), pellet (lane 5) and glutathione-agarose resin eluate (lane 6) from the induced cells were analyzed by SDS-

PAGE. **d** Representative TAT-ETD-Flag (for the wt form) isolation. GST-TAT-ETD-Flag (wt) protein bound to glutathione-agarose resin incubated for 16 h with TEV protease at 8 °C (lane 1). TAT-ETD-Flag peptides (lane 3) separated from TEV protease (lane 2) by Microcon-10[®] centrifugal filters. Samples from each step were analyzed by SDS-PAGE. **e** Coomassie staining (Left panels) or immunoblotting (Right panel) of all TAT-ETD-Flag peptides (as indicated) isolated as in B and D (odd lane numbers indicate retained TEV fractions, whereas even lane numbering indicates purified TEV-free peptide fractions)

of a significant fraction of endogenous HIF-1 α to the cytoplasm (Fig. 3b), while the TAT-ETD-SA form, which was itself predominantly cytoplasmic, did not affect the nuclear localization of HIF-1 α (Fig. 3b, c). As expected from the mislocalization of HIF-1 α , treatment with the nuclear TAT-ETD-wt, -SE and -IA variants (which from now on will be referred to as HIF-1-inhibitory peptides or HIPs) resulted in a significant decrease of HRE-dependent transcriptional activity, which was not affected by the cytoplasmic TAT-ETD-SA form (Fig. 4a). Therefore, the transduced recombinant and bacterially produced ETD peptide derivatives behaved almost indistinguishably from their counterparts produced inside the cancer cells through plasmid-driven overexpression. To confirm the effects of the TAT-ETD peptides of HIF-1 transcriptional activity, expression of

known hypoxia-inducible genes was analyzed in cells treated with the peptides. Both mRNA and protein VEGF levels, a common HIF-1 and HIF-2 gene target, were indeed reduced after treatment with all HIPs (TAT-ETD-IA form being the more potent inhibitor), but not by TAT-ETD-SA (Fig. 4b and inset). To test the selectivity of this inhibition, expression of gene targets unique to either HIF-1 or HIF-2 was then analyzed. As expected by the fact that the ETD sequence is not conserved in HIF-2 α , expression of *P4HA1* and *NDRG1*, genes known to be controlled exclusively by HIF-1 [27, 28], was inhibited by most HIPs (Fig. 4c), while expression of *PAI-1* and *FSPI*, genes known to be under the exclusive control of HIF-2 [29, 30], was not affected in HIF-2 α -expressing Huh7 cells (Fig. 4d and inset). In both the *P4HA1* and *NDRG1* cases, the TAT-ETD-SA form was

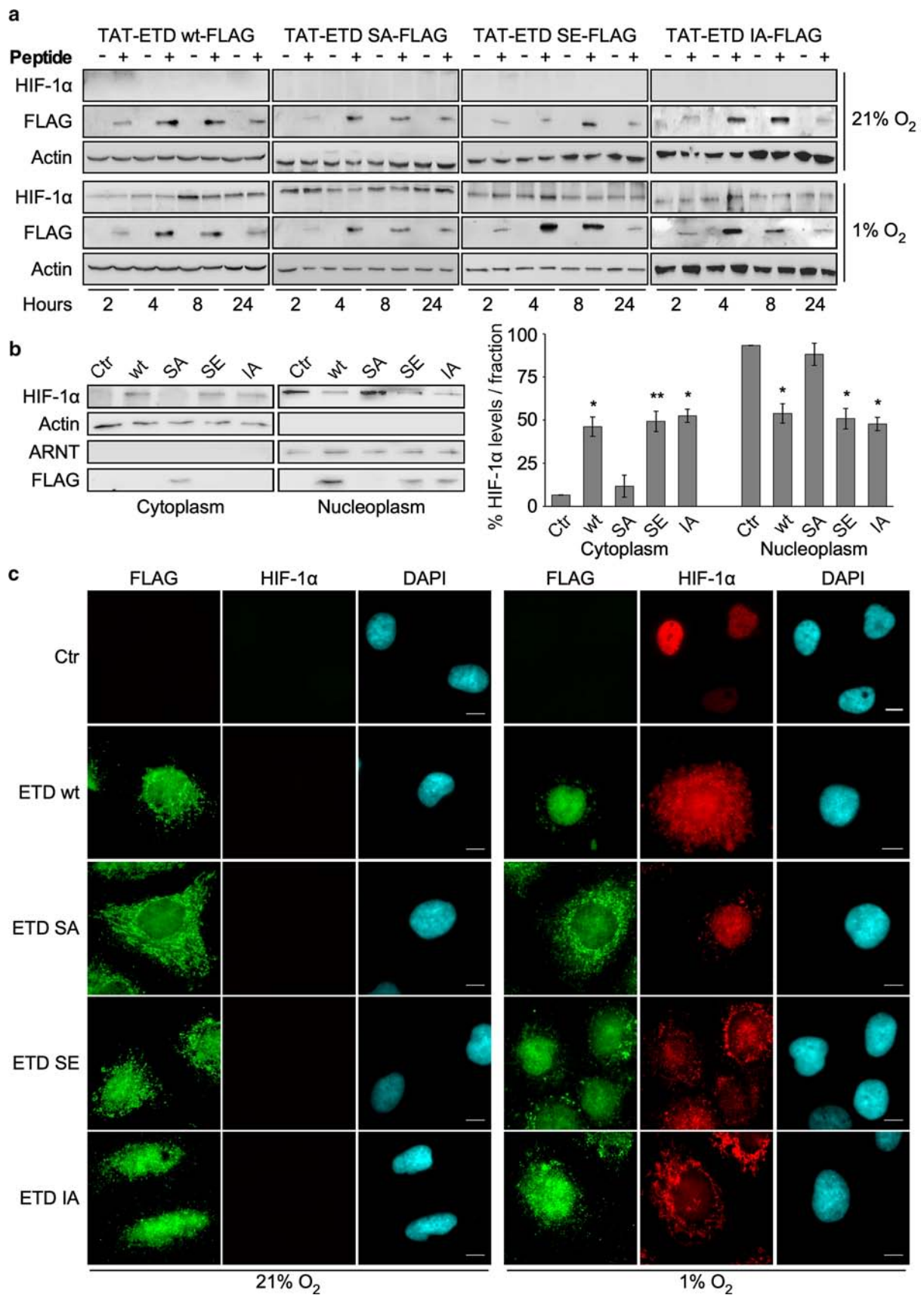


Fig. 3 Huh7 cells penetration by TAT-ETD-Flag peptides and its influence on HIF-1 α induction and localization. **a** TAT-ETD-Flag peptides (as indicated) were added to the culture medium of Huh7 cells kept under normoxia or hypoxia for the indicated time periods. Total cell extracts (60 μ g of protein) were analyzed by immunoblotting with indicated antibodies. **b** Western blotting (left panel) of subcellular fractions (60 μ g) derived from Huh7 cells, grown under hypoxia for 4 h and treated with TAT-ETD-Flag peptides (as indicated), using the indicated antibodies. Actin and ARNT were used as fractionation controls. Quantitative analysis (right panel) of immunoblots depicting the percentage of HIF-1 α levels in each fraction after TAT-ETD-Flag treatment (as indicated) representing the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm s.e.m. ($n=9$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ —compared to the respective normoxic or hypoxic control). **c** Immunofluorescence microscopy of Huh7 cells treated as in A and incubated under normoxia or hypoxia for 8 h. Cell-permeable peptides and endogenous HIF-1 α were detected with anti-Flag and anti-HIF-1 α antibodies, respectively (scale = 10 μ m)

inactive, while the TAT-ETD-IA form was the most potent inhibitor of their HIF-1-driven expression. Those results were confirmed in HeLa and HepG2 cell lines treated with TAT-ETD-SA or TAT-ETD-IA peptide forms by determination of *LPIN1* (HIF-1 target, [15]) or *PAI-1* (HIF-2 target) mRNA levels (Sup. Figure 1).

Taken together, these results show that cell-penetrating ETD peptide derivatives that can be phosphorylated by ERKs (ETD-wt and ETD-IA forms) or mimic phosphorylation (ETD-SE form) accumulate inside the nucleus, mislocalize HIF-1 α and selectively inhibit HIF-1-dependent transcriptional activity. These, together with the fact that the phosphorylation-deficient ETD-SA form resides in the cytoplasm and leaves HIF-1 α unaffected, suggest that the inhibitory peptides act as specific blockers of ERK-mediated HIF-1 α modification (being themselves modified instead) and, additionally, their phosphorylated forms may also impair the interaction of residually modified HIF-1 α with chromatin components essential for transcriptional activation of HIF-1 target genes. In any case, the TAT-ETD-IA variant is shown to be an agent that can efficiently inhibit HIF-1 activity without affecting HIF-2 and can therefore be used to study the requirement of HIF-1 for cancer cell adaptation to hypoxia.

HIPs interfere with lipid synthesis and the migratory potential of cancer cells only under hypoxia

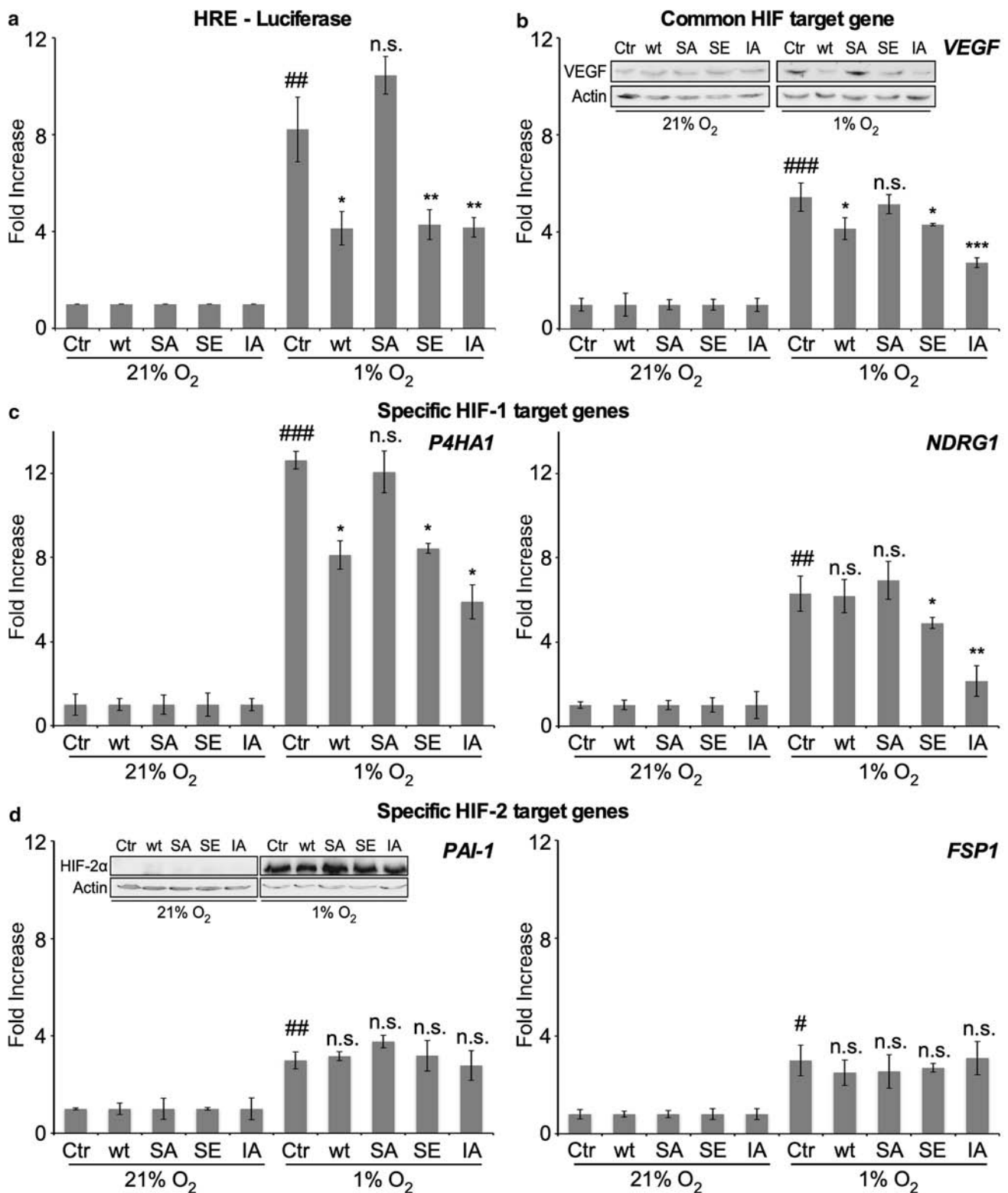
Cancer cells respond to lack of oxygen in several ways: they reprogram their metabolism, migrate away from the hypoxic areas and restrict actively the apoptotic processes that may be initiated by oxygen-deficient mitochondria. These adaptive changes are mostly mediated by HIFs; however, it is not always clear which HIF isoform is involved, especially in cells that express both HIF-1 and HIF-2, such as hepatocarcinoma cells. The HIPs were, therefore, analyzed, as selective HIF-1 inhibitors, for their effects on characteristic

cancer cell properties that facilitate their survival and proliferation under hypoxia.

We have previously reported that a metabolic prerequisite for cancer cell proliferation under hypoxia is accumulation of lipid droplets, a process that involves HIF-1-dependent induction of Lipin1, a product of the *LPIN1* gene and a key enzyme in triglyceride biosynthesis [15, 31]. As for the other tested HIF-1 targets, induction of *LPIN1* expression by hypoxia was abolished after transduction of HIPs, but not affected by treatment with TAT-ETD-SA (Fig. 5a). Consequently, lipid droplet accumulation under hypoxia was significantly reduced (to almost normoxic levels) when cells were treated with HIPs, which, however, did not affect at all lipid droplet formation under normoxia (Fig. 5b, c). Another aspect of cancer cell biology is their migratory potential, which is often increased under low oxygen conditions [32, 33]. Since transduction of inhibitory TAT-ETD peptides reduced *P4HA1* expression, a gene encoding for an enzyme shown to be involved in cell migration [28], we tested the effect of the peptides on Huh7 cell migration under hypoxia using wound-healing assays. Under normoxia, none of the cell-penetrating peptides affected the distance traversed by Huh7 cells (Fig. 5d upper panels and graph). In contrast, under hypoxia the HIPs (TAT-ETD-SE and -IA, especially) diminished significantly the distance covered by the cells (Fig. 5d lower panels and graph), indicating a strong negative effect on the migratory ability of the hypoxic cells. Both results demonstrate the importance of HIF-1-mediated gene expression for adaptive functions of hepatocarcinoma cells under hypoxia.

HIPs impair cancer cell colony formation and cause cell death by inducing apoptosis under hypoxia

A prominent trait of cancer cells is the ability of a single cell to produce an indefinite number of progeny and thus create a colony. To test the ability of HIPs to target also this property of cancer cells under low oxygen conditions, clonogenic assays were performed with Huh7 cells. The number of colonies formed from Huh7 cells significantly increased under hypoxia in the absence of any peptide. However, at least two of the HIPs decreased the number of hypoxic colonies to normoxic levels, with the TAT-ETD-IA variant giving the strongest effect (Fig. 6a). The diminished ability of cancer cells to form more colonies under hypoxia and in the presence of HIPs further suggests a proliferation defect that may be due to slower cell cycle or increased cell death rates. Indeed, treatment with the TAT-ETD-SE and -IA peptides practically blocked cellular proliferation under hypoxia (Fig. 6b; right panel), although treating the cells with any of the peptides under normoxia had no effect on proliferation (Fig. 6b; left panel). In agreement with these results, cell death rate was not affected by the peptides under normoxia (Fig. 6c; left panel), but was significantly



increased by the transduction of HIPs, with TAT-ETD-IA being the most potent stimulant of cell death under hypoxia in three different cell lines (Fig. 6c; right panel and Sup. Fig. 2). To test whether the effects of the cell-penetrating HIPs on

cell viability involved stimulation of apoptosis, three different types of apoptosis detection assays were employed. First, phosphatidylserine exposure to the outer leaflet of plasma membrane was determined by CF555-Annexin V staining.

Fig. 4 Cell-permeable TAT-ETD-Flag peptides exhibiting nuclear localization inhibit HIF-1, but not HIF-2 target gene expression. **a** TAT-ETD-Flag peptides (as indicated) added to the culture medium of Huh7 cells transfected with the pGL3-5HRE-VEGF and pCI-Renilla reporter plasmids. Cells were incubated under normoxia or hypoxia for 16 h. Values are ratios of firefly luciferase activity over Renilla activity expressed as fold increase in hypoxia in relation to normoxia and represent the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm s.e.m. ($n=9$; n.s.: non-significance, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ —compared to hypoxic control; ### $P<0.01$ —compared to normoxic control). **b–d** RT-PCR determination of mRNA expression levels of shared (**b**; *VEGF*), HIF-1-exclusive (**c**; *P4HA1*, *NDRG1*) and HIF-2-exclusive (**d**; *PAI-1*; *FSP1*) target genes in Huh7 cells treated as in **a** (as indicated). Results are shown as fold increase in relation to the corresponding normoxic conditions and represent the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm s.d. ($n=9$; ns non-significance, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ —compared to hypoxic control; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ —compared to normoxic control). Immunoblots shown as insets inside graphs analyze VEGF (**b**) or HIF-2 α (**d**) expression levels in Huh7 cells treated as in **a** (as indicated) and are indicative of two independent experiments. Actin was used as loading control

This revealed that treatment of Huh7 cells with HIPs resulted in induction of apoptosis to a significantly higher number of cells compared to no peptide addition or treatment with TAT-ETD-SA and only under hypoxic conditions (Fig. 7a and Sup. Fig. 3a). Second, analysis of executive caspase activation as determined by the production of cleaved caspase 3 showed that, although none of the cell-penetrating peptides triggered apoptosis in Huh7 cells under normoxia (Fig. 7b; lanes 1–5), treatment with HIPs (especially, the IA form) under hypoxia induced the onset of apoptosis as evidenced by caspase 3 activation without, however, affecting HIF-1 α levels or ERK1/2 activation (Fig. 7b; lanes 6–10). Treatment with TAT-ETD-SA as in all other cases acted as a phosphorylation-specific negative control (Fig. 7b; lane 8). The potential of IA form to induce apoptosis under hypoxia was also confirmed by caspase 3 cleavage in HeLa or HepG2 cells treated with TAT-ETD-SA or -IA peptide forms (Sup. Fig. 3c). Third, detection of apoptotic DNA fragmentation using the TUNEL method also showed significantly increased number of apoptotic Huh7 cells only under hypoxia after HIP treatment in contrast to hypoxia alone or TAT-ETD-SA addition (Fig. 7c and Sup. Fig. 3b). In summary, our data show that treatment with cell-permeable peptides targeting ERK-mediated regulation of HIF-1 α inhibits proliferation and causes apoptotic cell death of cancer cells subjected to hypoxia. These effects are specific, as no defects, whatsoever, are observed when the peptides are introduced into the cells under normoxia.

Discussion

HIF-mediated signaling renders hypoxic tumors aggressive and resistant to conventional methods of treatment. Hence, inhibition of HIF activity offers an attractive

approach to kill cancer cells in hypoxic solid tumors [6, 7]. However, inhibition of transcription factors cannot be easily achieved by small size chemical inhibitors [34, 35]. An alternative and promising approach to target transcription factors is the use of cell-penetrating peptides providing that a suitable inhibitory sequence has been experimentally determined [36–38].

In the present study, we report the generation of cell-penetrating peptides that are based on the ETD domain of HIF-1 α and specifically inhibit HIF-1 activity and block cancer cell growth under hypoxia. The ETD domain of HIF-1 α (amino acids 616–658) is situated inside the inhibitory domain (ID) (amino acids 576–785) of HIF-1 α [4], the presence of which was originally shown to curtail the transcriptional activity of its neighboring TAD domains. Our previous results indicated that the ETD domain of HIF-1 α may be used as an HIF-1 inhibitor, since its overexpression as an independent polypeptide repressed HRE-dependent transcriptional activity in contrast to its phosphorylation-deficient mutant form [14]. We, now, show that mutant variants of the ETD domain that either mimic its phosphorylation by ERK (ETD-SE) or are constitutively nuclear by harbouring a mutated NES (ETD-IA) are also inhibitors of HRE-dependent transcriptional activity, as they can displace HIF-1 α from the nucleus. Importantly, the presence of the TAT sequence in the chimeric peptides did not alter their localization compared with the ETDs produced inside transfected cells.

Phosphorylatable (TAT-ETD-wt and NES mutant TAT-ETD-IA) and phosphomimetic (TAT-ETD-SE) forms (together termed as HIPs) were nuclear, mislocalized HIF-1 α in the cytoplasm and inhibited HIF-1 activity, whereas the phosphodeficient TAT-ETD-SA form was mainly cytoplasmic and did not affect HIF-1 α localization or activity.

These results are fully consistent and support our previously proposed mechanism involving the presence of an NES inside the ETD domain of endogenous HIF-1 α that acts as a molecular switch: its phosphorylation by ERK switches it off and efficiently traps HIF-1 α inside the nucleus, while absence of phosphorylation switches it on and leads HIF-1 α to the cytoplasm. Thus, the inhibitory potential of the TAT-ETD-wt and TAT-ETD-IA peptides can be explained by their ability to act as substrates of ERK and, therefore, compete in a sequence-specific manner with endogenous HIF-1 α for interaction with ERK [14]. The localization and inhibitory potential of the phosphomimetic TAT-ETD-SE mutant further suggests that once phosphorylated, the nuclear ETD peptides also compete with residually modified HIF-1 α for binding to nuclear factors that are required for HIF-1 target gene expression as transcriptional coactivators. The strongest effect of the TAT-ETD-IA form in all biological tests could be explained by its stronger nuclear accumulation, due to the NES mutation, which in turn allows for more effective phosphorylation by nuclear ERKs and, subsequently, leads

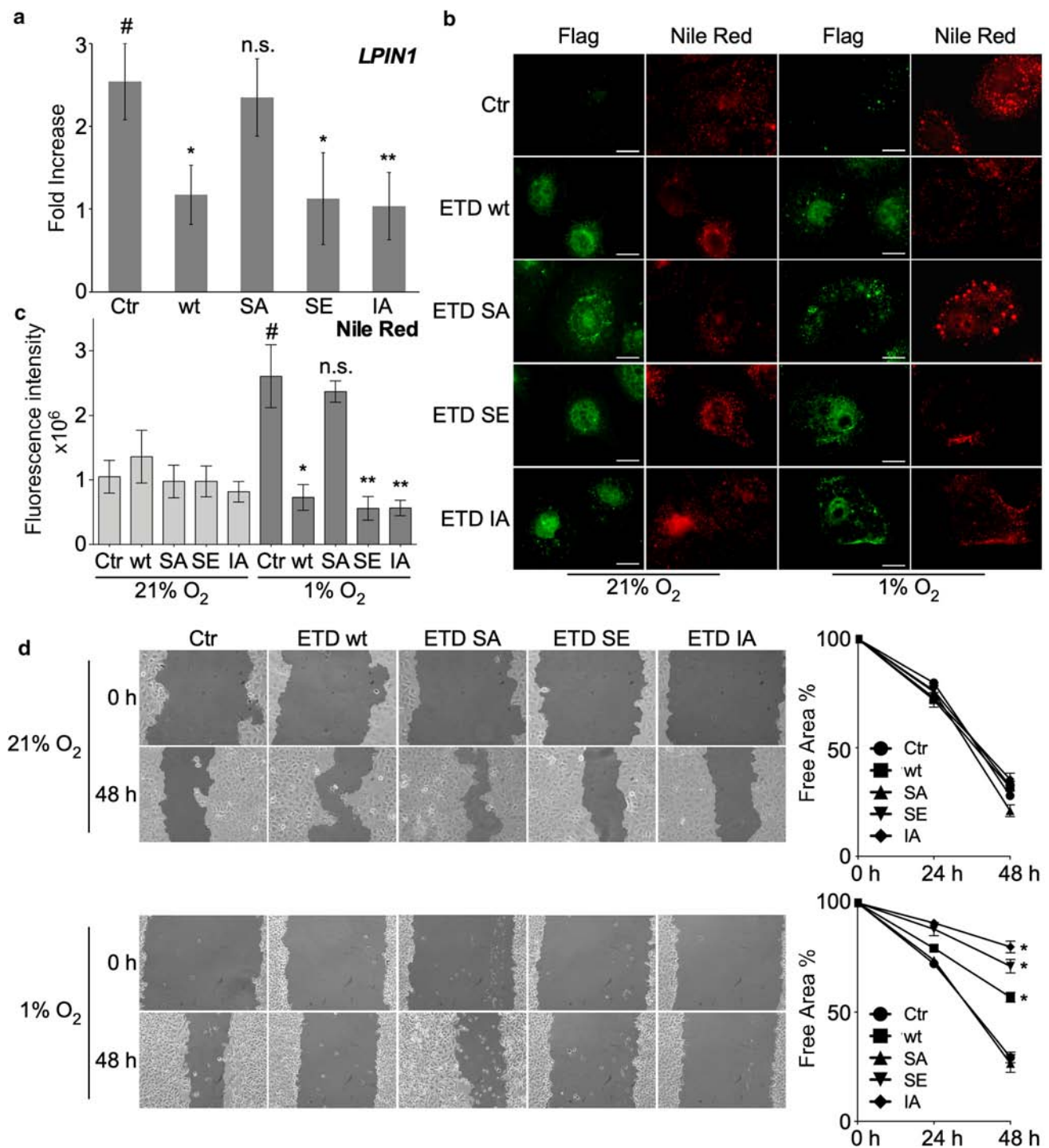


Fig. 5 Nuclear TAT-ETD-Flag peptides impair lipid droplet formation and migration ability of Huh7 cells under hypoxia. **a** RT-PCR determination of *LPIN1* mRNA levels. Huh7 cells were treated with TAT-ETD-Flag peptides (as indicated) and incubated under normoxia or hypoxia for 16 h. Results are shown as fold increase in relation to the corresponding normoxic conditions and represent the mean of two independent experiments performed in triplicate \pm s.d. ($n=6$; ns non-significance, $*P<0.05$, $**P<0.01$ —compared to hypoxic control; $#P<0.05$ —compared to normoxic control). **b** Immuno-fluorescence microscopy of Huh7 cells treated as in A and incubated under normoxia or hypoxia for 24 h with anti-Flag antibody and stained

with Nile Red (scale=10 μ m). **c** Quantitative analysis of immuno-fluorescence images collected in B representing the fluorescence intensity of Nile Red staining of 50 cells from three independent experiments (\pm s.e.m.; n.s.: non-significance, $*P<0.05$, $**P<0.01$ —compared to hypoxic control; $#P<0.05$ —compared to normoxic control). **d** Wound-healing assay of Huh7 cells treated with TAT-ETD-Flag peptides (as indicated) and incubated under normoxia (upper panels) or hypoxia (lower panels) for 0–48 h. Digitized graphs show the % reduction of initial scratch area at the indicated time points (mean of ten individual measurements from two independent experiments \pm s.e.m. for each condition; $*P<0.05$)

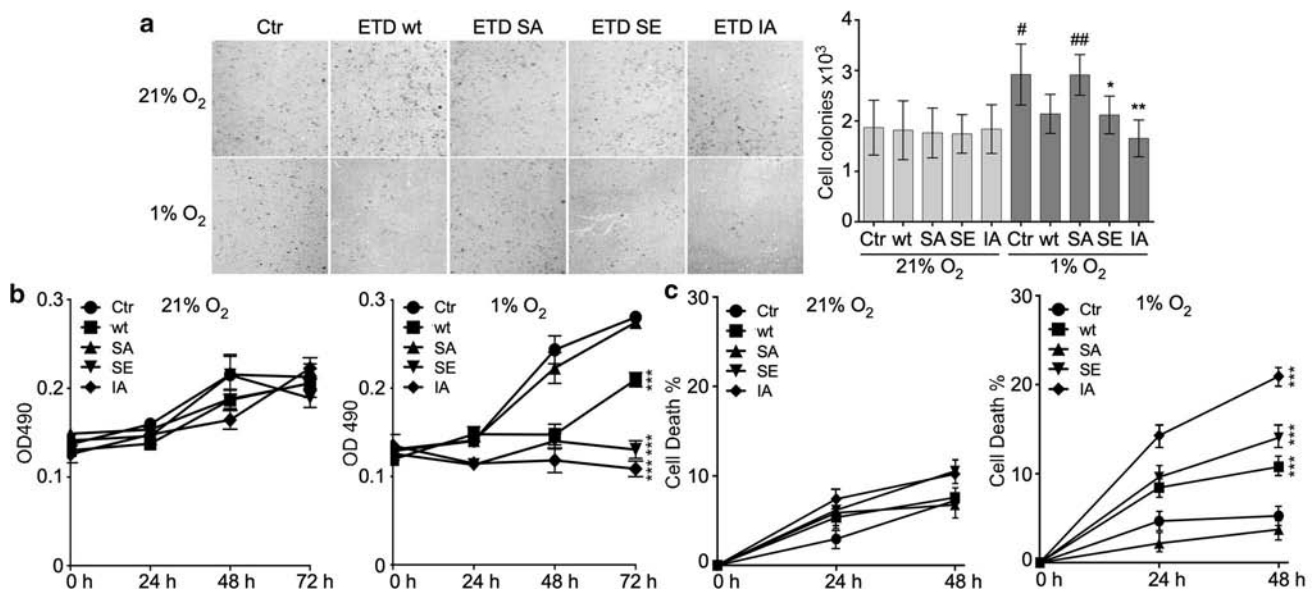


Fig. 6 Treating Huh7 cells with nuclear TAT-ETD-Flag peptides impairs colony formation and decreases cancer cell survival under hypoxia. **a** Representative images of colonies produced by Huh7 cells incubated under normoxia or hypoxia for 96 h in the presence of TAT-ETD-Flag peptides (as indicated). Digitized graph depicts the number of colonies in each condition as measured by ImageJ software (five independent experiments \pm s.e.m.; ns non-significance,

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ —compared to hypoxic control; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ —compared to the normoxic control). **b**, **c** Determination of cell proliferation **b** and cell death **c** of Huh7 cells treated with TAT-ETD-Flag peptides (as indicated) and incubated under normoxia (left panel) or hypoxia (right panel) for the indicated time periods. Data are the mean from two independent experiments performed in triplicate \pm s.e.m ($n=6$; *** $P<0.001$)

to more efficient inhibition of both HIF-1 α modification and its phosphorylation-dependent interactions.

The inability of the phosphodeficient TAT-ETD-SA form, which differs only in the two ERK-targeted residues (Table S1), to affect HIF-1 activity or any cancer cell properties further corroborates that the HIPs act exclusively by disturbing the ERK-dependent activation of HIF-1 α . The effects of HIPs on cancer cell properties were strictly observed only under hypoxia, further confirming their HIF specificity. Furthermore, HIPs reduced the expression of common or HIF-1-only target genes and did not affect the expression of genes regulated by HIF-2 [29, 30], showing their high level of selectivity against HIF-1 α . This agrees with the fact that although HIF- α s share similarity in their dimerization and transactivation domains, both serine residues targeted by ERKs in HIF-1 α , and the ETD domain in general, are not conserved in HIF-2 α [13]. This HIF-1 selectivity signifies that apart from their anticancer potential, HIPs might serve as biochemical tools to distinguish between the unique and many times divergent HIF-1/HIF-2 cellular function [2, 30] or enable to shed light in recently described non-genomic HIF-1 α functions [16, 39]. As expected by the inhibition of HIF-1 activity, HIPs impaired different HIF-1-dependent processes such as accumulation of lipid droplets [15, 31, 40], which is required under hypoxia to avoid lipotoxicity [41, 42], or enhanced migration and colony formation [1] that also

typify hypoxic cancer cell behavior. More importantly, treatment with HIPs triggered apoptotic cell death under hypoxia, showing the potential of HIPs as lead compounds for the generation of anticancer agents that will target hypoxic tumors but not normally oxygenated cells.

There have been numerous previous reports concerning chemical agents that block HIF-1 activation (reviewed in [43]) by, e.g., impairing HIF-1 α synthesis [44], inhibiting signaling pathways [45, 46] or promoting HIF-1 α destabilization [47]. Compounds were also identified that target the ability of HIF-1 α to dimerize with ARNT [48], bind to DNA [49] or associate with CBP/p300 [50]. However, most of these chemicals were not selective for the hypoxic machinery or lacked specificity for HIF-1 α , since they targeted common partners of all HIF isoforms [51, 52]. On the other hand, there have been examples of peptides that either compete for HIF- α or ARNT binding [38, 53] or imitate p300/CBP binding to the C-TAD domain of HIF-1 α [37] and thus inactivate HIF-1. The specificity of these peptides was also limited because they targeted domains conserved in all HIF isoforms or also affected the function of unrelated transcription factors sharing the same binding partners. In contrast, HIPs, as cell-penetrating peptides based on the ETD domain of HIF-1 α and blocking the ERK-dependent activation of HIF-1, are the first examples of agents that exhibit strict HIF-1 isoform-specific inhibition and exert their activity exclusively under hypoxia.

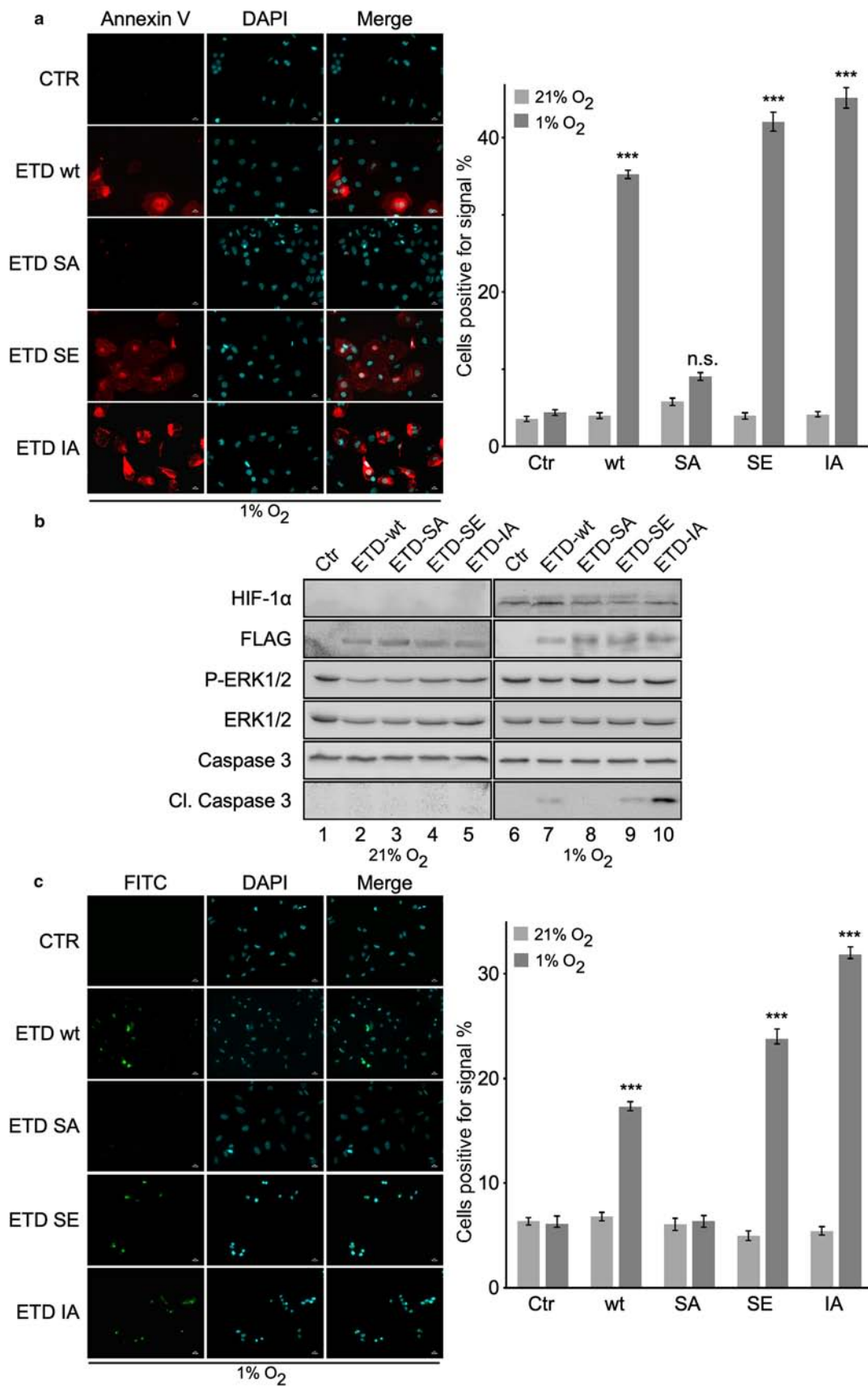


Fig. 7 Nuclear-localized TAT-ETD-Flag peptides induce apoptosis of Huh7 cells under hypoxia. **a** AnnexinV fluorescence microscopy of Huh7 cells treated with TAT-ETD-Flag peptides (as indicated) and incubated under hypoxia for 48 h (Scale = 10 μ m). Digitized graph represents the % ratio of Annexin V-positive cells in relation to the total number of cells \pm s.e.m under normoxia or hypoxia (as indicated; *** P < 0.001). Data represent the results of two independent experiments (230–270 individual cells). **b** Cell lysates (60 μ g) from Huh7 cells treated as in A, incubated under normoxia (lanes 1–5) or hypoxia (lanes 6–10) for 48 h and analyzed with immunoblotting with the indicated antibodies. **c** Fluorescence microscopy of TUNEL assay of Huh7 cells exposed to hypoxia and TAT-ETD-Flag peptides for 48 h. Digitized graph represents the % ratio of fluorescent positive cells in relation to the total number of cells \pm s.e.m under normoxia or hypoxia (as indicated; *** P < 0.001). Data represent results from two independent experiments (230–290 individual cells)

In conclusion, the reduced oxygen conditions of solid tumors evoke changes that support cancer progression mainly by HIF activation. Moreover, HIFs render hypoxic tumor cells resistant to conventional chemotherapy or radiation treatment [54, 55]. Trials with compounds that target the accumulation of the oxygen-regulated HIF- α subunit or its association with ARNT have established HIF- α s as attractive targets of anticancer strategies [8, 56, 57]. Thus, the development of selective HIF inhibitors, to be used in combination with traditional agents or other targeted therapies, is a very important but still largely elusive task. Chemical inhibitors of ERK activation and ERK-mediated phosphorylation of HIF-1 α can efficiently block HIF-1 activity [13, 14], but the use of kinase inhibitors can have off-target undesirable effects. Instead, targeting the ERK-dependent function of HIF-1 by cell-penetrating peptides such as the ETD-derived HIPs described in this study is a very specific way to restrain HIF-1-dependent hypoxic cancer cell growth and offer proof of principle for the development of peptidomimetic agents with therapeutic potential against cancer.

Acknowledgements We are grateful to Prof. K. Pantopoulos (McGill University, Montreal, Quebec, Canada) for offering tTA-HepG2 cells. A.K. is supported by a fellowship from States Scholarship Foundation (IKY). This work was partially supported by the “ARISTEIA II” Action of the “OPERATIONAL PROGRAM EDUCATION AND LIFELONG LEARNING” (HYPOXYTARGET 3129 to G.S.) co-funded by the European Social Fund (ESF) and National Resources and by a Research Grant in Biomedical Sciences funded by Fondation Santé (5360 to I.M.).

Author contributions IM and GS conceived the study and carried out its design. AK and MK performed the experiments. AK, GS and IM analyzed data and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interests.

References

- Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Amelio I (2018) The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis* 7(1):10. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0011-9>
- Keith B, Johnson RS, Simon MC (2012) HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev* 12(1):9–22
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1):617–626
- Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL (1997) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 272(31):19253–19260
- Semenza GL (2013) HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 123(9):3664–3671. <https://doi.org/10.1172/JCI67230>
- Schito L, Semenza GL (2016) Hypoxia-inducible factors: master regulators of cancer progression. *Trends Cancer* 2(12):758–770. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.10.016>
- Poon E, Harris AL, Ashcroft M (2009) Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Rev Mol Med* 11:e26. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001173>
- Chen W, Hill H, Christie A, Kim MS, Holloman E, Pavia-Jimenez A, Homayoun F, Ma Y, Patel N, Yell P, Hao G, Yousuf Q, Joyce A, Pedrosa I, Geiger H, Zhang H, Chang J, Gardner KH, Bruick RK, Reeves C, Hwang TH, Courtney K, Frenkel E, Sun X, Zojwalla N, Wong T, Rizzi JP, Wallace EM, Josey JA, Xie Y, Xie XJ, Kapur P, McKay RM, Brugarolas J (2016) Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature* 539(7627):112–117. <https://doi.org/10.1038/nature19796>
- Eltzschig HK, Bratton DL, Colgan SP (2014) Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 13(11):852–869. <https://doi.org/10.1038/nrd4422>
- Dengler VL, Galbraith MD, Espinosa JM (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49(1):1–15. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.838205>
- Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY (2016) Hypoxia-inducible factors (HIFs) and phosphorylation: impact on stability, localization, and transactivity. *Front Cell Dev Biol* 4:11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00011>
- Kalouisi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G (2010) Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci* 123(17):2976–2986. <https://doi.org/10.1242/jcs.068122>
- Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalouisi A, Georgatsou E, Bonanou S, Simos G (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 281(44):33095–33106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605058200>
- Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G (2008) Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *J Biol Chem* 283(41):27620–27627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803081200>
- Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniosoglou S, Simos G (2012) Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J Cell Sci* 125(14):3485–3493. <https://doi.org/10.1242/jcs.106682>
- Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G (2017) Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1 α to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci* 130(2):466–479. <https://doi.org/10.1242/jcs.195339>
- Mylonis I, Lakka A, Tsakalof A, Simos G (2010) The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and

- hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 398(1):74–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.038>
18. Rizzuti M, Nizzardo M, Zanetta C, Ramirez A, Corti S (2015) Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discov Today* 20(1):76–85. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.017>
19. Cabrita LD, Gilis D, Robertson AL, Dehouck Y, Rooman M, Bottomley SP (2007) Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design. *Protein Sci* 16(11):2360–2367. <https://doi.org/10.1110/ps.072822507>
20. Hausmann A, Lee J, Pantopoulos K (2011) Redox control of iron regulatory protein 2 stability. *FEBS Lett* 585(4):687–692. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.036>
21. Andrews NC, Faller DV (1991) A rapid microprep preparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucl Acids Res* 19(9):2499
22. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, Bonanou S, Georgatsou E (2007) MgcRacGAP interacts with HIF-1 α and regulates its transcriptional activity. *Cell Physiol Biochem* 20(6):995–1006. <https://doi.org/10.1159/000110460>
23. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100(3):965–973
24. Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2(2):329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
25. Rafehi H, Orlowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC (2011) Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/2573>
26. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A (2014) Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 13(9):1400–1412. <https://doi.org/10.4161/cc.28401>
27. Cangul H (2004) Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. *BMC Genet* 5:27. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-5-27>
28. Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D, Semenza GL (2013) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem* 288(15):10819–10829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.42939>
29. Befani C, Liakos P (2018) The role of hypoxia-inducible factor-2 α in angiogenesis. *J Cell Physiol* 233(12):9087–9098. <https://doi.org/10.1002/jcp.26805>
30. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J (2010) HIF-1 and HIF-2 transcription factors—similar but not identical. *Mol Cell* 29(5):435–442. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0067-2>
31. Kourti M, Ikonou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniosoglou S, Lygerou Z, Simos G, Mylonis I (2015) CK1 δ restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1 α /ARNT complex formation. *Cell Signal* 27(6):1129–1140. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.02.017>
32. Gilkes DM, Xiang L, Lee SJ, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D, Semenza GL (2014) Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(3):E384–E393. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321510111>
33. Hoffmann C, Mao X, Brown-Clay J, Moreau F, Al Absi A, Wurzer H, Sousa B, Schmitt F, Berchem G, Janji B, Thomas C (2018) Hypoxia promotes breast cancer cell invasion through HIF-1 α -mediated up-regulation of the invadopodial actin bundling protein CSRP2. *Sci Rep* 8(1):10191. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28637-x>
34. Berg T (2008) Inhibition of transcription factors with small organic molecules. *Curr Opin Chem Biol* 12(4):464–471. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.023>
35. Fry DC, Vassilev LT (2005) Targeting protein-protein interactions for cancer therapy. *J Mol Med (Berl)* 83(12):955–963. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0705-x>
36. Johnson RM, Harrison SD, Maclean D (2011) Therapeutic applications of cell-penetrating peptides. *Methods Mol Biol* 683:535–551. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-919-2_38
37. Kung ALWS, Klcio JM, Kaelin WG, Livingston DM (2000) Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med* 6(12):1335–1340
38. Wang X, Qiao Y, Asangani IA, Ateeq B, Poliakov A, Cieslik M, Pitchiaya S, Chakravarthi B, Cao X, Jing X, Wang CX, Apel IJ, Wang R, Tien JC, Juckette KM, Yan W, Jiang H, Wang S, Varambally S, Chinnaiyan AM (2017) Development of peptidomimetic inhibitors of the erg gene fusion product in prostate cancer. *Cancer Cell* 31(4):532–548.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.017>
39. Hubbi ME, Kshitiz Gilkes DM, Rey S, Wong CC, Luo W, Kim DH, Dang CV, Levchenko A, Semenza GL (2013) A nontranscriptional role for HIF-1 α as a direct inhibitor of DNA replication. *Sci Signal* 6(262):ra10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003417>
40. Triantafyllou EA, Georgatsou E, Mylonis I, Simos G, Paraskева E (2018) Expression of AGPAT2, an enzyme involved in the glycerophospholipid/triacylglycerol biosynthesis pathway, is directly regulated by HIF-1 and promotes survival and etoposide resistance of cancer cells under hypoxia. *Biochim Biophys Acta* 1863(9):1142–1152. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2018.06.015>
41. Bensaad K, Favaro E, Lewis CA, Peck B, Lord S, Collins JM, Pinnick KE, Wigfield S, Buffa FM, Li JL, Zhang Q, Wakelam MJO, Karpe F, Schulze A, Harris AL (2014) Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Rep* 9(1):349–365. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.056>
42. Zaidi N, Lupien L, Kuemmerle NB, Kinlaw WB, Swinnen JV, Smans K (2013) Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Prog Lipid Res* 52(4):585–589. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.08.005>
43. Rey S, Schito L, Wouters BG, Eliasof S, Kerbel RS (2017) Targeting hypoxia-inducible factors for antiangiogenic cancer therapy. *Trends Cancer* 3(7):529–541. <https://doi.org/10.1016/j.treca.2017.05.002>
44. Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW (2001) Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 α enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther* 8(8):638–645. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301388>
45. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT (2002) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22(20):7004–7014
46. Tan C, de Noronha RG, Roecker AJ, Pyrzynska B, Khwaja F, Zhang Z, Zhang H, Teng Q, Nicholson AC, Giannakakou P, Zhou W, Olson JJ, Pereira MM, Nicolaou KC, Van Meir EG (2005) Identification of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. *Cancer Res* 65(2):605–612
47. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM (2002) Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α -degradative pathway. *J Biol Chem* 277(33):29936–29944. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204733200>

48. Lee K, Zhang H, Qian DZ, Rey S, Liu JO, Semenza GL (2009) Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(42):17910–17915. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909353106>
49. Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, Fisher RJ, Shoemaker RH, Melillo G (2005) Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 65(19):9047–9055. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1235>
50. Kung AL, Zabudoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, Cornell-Kennon S, Lee J, Wang B, Wang J, Memmert K, Naegeli HU, Petersen F, Eck MJ, Bair KW, Wood AW, Livingston DM (2004) Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell* 6(1):33–43. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.009>
51. Singh V, Nand A, Chen C, Li Z, Li SJ, Wang S, Yang M, Merino A, Zhang L, Zhu J (2014) Echinomycin, a potential binder of FKBP12, shows minor effect on calcineurin activity. *J Biomol Screen* 19(9):1275–1281. <https://doi.org/10.1177/1087057114544742>
52. Yano K, Horinaka M, Yoshida T, Yasuda T, Taniguchi H, Goda AE, Wakada M, Yoshikawa S, Nakamura T, Kawauchi A, Miki T, Sakai T (2011) Chetomin induces degradation of XIAP and enhances TRAIL sensitivity in urogenital cancer cells. *Int J Oncol* 38(2):365–374. <https://doi.org/10.3892/ijo.2010.874>
53. Miranda E, Nordgren IK, Male AL, Lawrence CE, Hoakwie F, Cuda F, Court W, Fox KR, Townsend PA, Packham GK, Eccles SA, Tavassoli A (2013) A cyclic peptide inhibitor of HIF-1 heterodimerization that inhibits hypoxia signaling in cancer cells. *J Am Chem Soc* 135(28):10418–10425. <https://doi.org/10.1021/ja402993u>
54. Rohwer N, Cramer T (2011) Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat* 14(3):191–201. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.03.001>
55. Zhang M, Qiu Q, Li Z, Sachdeva M, Min H, Cardona DM, DeLaney TF, Han T, Ma Y, Luo L, Ilkayeva OR, Lui K, Nichols AG, Newgard CB, Kastan MB, Rathmell JC, Dewhirst MW, Kirsch DG (2015) HIF-1 α regulates the response of primary sarcomas to radiation therapy through a cell autonomous mechanism. *Radiat Res* 183(6):594–609. <https://doi.org/10.1667/RR14016.1>
56. Cho H, Du X, Rizzi JP, Liberzon E, Chakraborty AA, Gao W, Carvo I, Signoretti S, Bruick RK, Josey JA, Wallace EM, Kaelin WG (2016) On-target efficacy of a HIF-2 α antagonist in pre-clinical kidney cancer models. *Nature* 539(7627):107–111. <https://doi.org/10.1038/nature19795>
57. Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, Rey S, Hammers H, Chang D, Pili R, Dang CV, Liu JO, Semenza GL (2008) Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(50):19579–19586. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809763105>



Protein phosphatase PPP3CA (calcineurin A) down-regulates hypoxia-inducible factor transcriptional activity

Angeliki Karagiota^a, Ilias Mylonis^a, George Simos^{a,b,**}, Georgia Chachami^{a,*}

^a Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece

^b Gerald Bronfman Department of Oncology, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:

Hypoxia
HIF-1
PPP3CA
Calcineurin
HIF-2

ABSTRACT

Hypoxia-inducible factors (HIF) are master regulators of the response to hypoxia. Although several kinases are known to modify their oxygen sensitive HIF- α subunits or affect indirectly their function, little is known about the role of phosphatases in HIF control. To address this issue, a library containing siRNAs for the 25 known catalytic subunits of human phosphatases was used to screen for their effect on HIF transcriptional activity in HeLa cells. Serine-threonine phosphatase PPP3CA (calcineurin A, isoform a) was identified as the strongest candidate for a negative regulator of HIF activity. Indeed, independent silencing of PPP3CA expression stimulated HIF transcriptional activity under hypoxia, without increasing the protein levels of HIF-1 α or HIF-2 α . Overexpression of a constitutively active PPP3CA form, but not its catalytically inactive counterpart, inhibited HIF activity and expression of HIF target genes but did not affect HIF-1 α or HIF-2 α expression. These results were phenocopied by treatment with the ionophore ionomycin, that activates endogenous PPP3CA. The effect of ionomycin was mediated by PPP3CA as it was largely abolished by PPP3CA silencing. Furthermore, ionomycin enhanced the down-regulation of HIF activity by wild-type PPP3CA overexpression. Overall, our results suggest the involvement of PPP3CA in fine-tuning the HIF-dependent transcriptional response to hypoxia.

1. Introduction

Exposure to low oxygen, termed hypoxia, characterizes many physiological as well as pathological events. Hypoxia causes gene expression reprogramming that facilitates anaerobic production of energy, increased oxygen delivery via stimulation of erythropoiesis and angiogenesis and many other adaptive changes that allow survival under low oxygen conditions. Crucial mediators of this response are the hypoxia-inducible factors (HIF) [1], a family of heterodimeric transcription factors composed of three oxygen regulated HIF- α subunits and their partner HIF- β (ARNT). The HIF-1 α and HIF-2 α isoforms possess structural and functional similarities and are expressed in a broad range of tissues but differ concerning their target genes, their expression profile in different cell types and tissues and their roles e.g. in erythropoiesis, metabolism and cancer development [2].

HIF- α subunits are continuously expressed and degraded in a ubiquitin-dependent manner that entails their hydroxylation by oxygen-dependent prolyl-hydroxylases (PHDs), subsequent polyubiquitination by a pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex and, finally, degradation by the proteasome [3]. Under low oxygen conditions PHDs

become inactive and, as a result, the HIF- α subunits get stabilized and transported into the nucleus, where they associate with ARNT to form HIF heterodimers that bind to hypoxia-response DNA elements (HREs) and promote expression of hypoxia target genes. In addition to oxygen-dependent hydroxylation, HIF- α are also regulated by intracellular signaling pathways that are activated in response to various stimuli like stress, hormones, cytokines, growth factors etc. Often these pathways lead to activation of kinases and phosphorylation events, which in turn can affect stability, nuclear translocation, transcriptional activity and protein-protein interactions of HIF-1 α [4–6]. For example, kinases such as GSK3, ATM, CDK1 and PLK3 target HIF-1 α directly and affect its protein stability [5], while others such as p38 α , p38 γ , ERK1/2 and CK1 δ indirectly or directly regulate HIF-1 α activity [5,7]. In the latter two cases, direct phosphorylation of HIF-1 α by ERK1/2 masks a CRM1-dependent nuclear export signal (NES) thus inhibiting its nuclear export and stimulating HIF-1 transcriptional activity [8], while phosphorylation of HIF-1 α by CK1 δ inhibits HIF-1 activity by destabilizing the HIF-1 α /ARNT complex [9]. Phosphorylation of HIF-2 α is less well studied, but HIF-2 α is known to be a target of PKD1, CK2 and CK1 δ [10–12]. In the last case and in contrast to HIF-1 α , modification of HIF-2 α by CK1 δ

* Corresponding author.

** Corresponding author. Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece.

E-mail addresses: simos@med.uth.gr (G. Simos), ghah@med.uth.gr (G. Chachami).

<https://doi.org/10.1016/j.abbi.2019.02.007>

Received 7 October 2018; Received in revised form 7 February 2019; Accepted 12 February 2019

Available online 15 February 2019

0003-9861/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

enhances HIF-2 activity [10], indicating that phosphorylation may be used as a means to differentially regulate HIF-1 and HIF-2 activities in cells that express both HIF isoforms.

Although the role of kinases in controlling HIF activity is well documented, very little is known about the protein phosphatases that reverse the phosphorylation of HIF- α subunits or their effectors. Furthermore, the involvement of phosphatases, which are mainly categorized as phosphoserine-phosphothreonine phosphatases (PSPs), phosphotyrosine phosphatases (PTPs) or dual specificity phosphatases (DUSPs) [13,14], in the cellular response to hypoxia is also poorly characterized. To address this issue, we now report the results of a siRNA screen that tested the effect of silencing human phosphatase catalytic subunits (PSPs and DUSPs) on HIF transcriptional activity under hypoxia. We also present data showing that one of the phosphatases identified by our screen, PPP3CA, also known as Calcineurin A (CnA) isoform a, inhibits HIF activity without affecting the expression or localization of the HIF- α subunits and can, therefore, play a role in the fine-tuning of the transcriptional response to hypoxia.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids

Plasmids expressing full length PPP3CA (CnAa) (pCMV-FLAG-CnA) and the constitutive active and constitutive inactive PPP3CA forms (pCMV-FLAG- Δ Camwt and pCMV-FLAG- Δ CamH151Q, respectively) were kindly provided by Prof. Dr. R. Marienfeld (University of Ulm, Germany) [15]. pEGFP-HIF-1 α and reporter plasmids pGL3-5XHRE-VEGF, pCI-Renilla and pGL3-HRE1–8 containing the human *LPIN1* promoter region, were previously described [16,17].

2.2. siRNA screen against human phosphatases

A sub-library, part of the Ambion *Silencer*[®] Select human phosphatase siRNA library (Life technologies-Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), composed of siRNAs targeting the catalytic subunits of the 25 known serine/threonine or dual-specificity phosphatases (3 different siRNAs for each target) was used for the siRNA screen (Table S1). HeLa cells were transiently co-transfected in 96-well plates with siRNAs (20 nM) and the luciferase reporter plasmids, using Lipofectamine[™] RNAiMAX (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). 48 h post-transfection cells were incubated for 8 h under hypoxic conditions (1% O₂) and the HRE-dependent luciferase activity was measured as described below. Firefly luciferase values were normalized against Renilla luciferase values and HIF transcriptional activity in each sample was calculated as fold increase of the normalized firefly luciferase values in relation to the corresponding values obtained from cells transfected with control siRNA and incubated under normoxia (negative control).

2.3. siRNA-mediated silencing of PPP3CA

PPP3CA expression was silenced using Hs-PPP3CA-6 FlexiTube siRNA (Qiagen, Venlo, Netherlands). AllStars siRNA (Qiagen) was used as negative control.

2.4. Cell cultures, transfection and luciferase assays

Human HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum penicillin-streptomycin (Biosera). Transient transfection was carried out in 24-well plates by using polyethylenimine (PEI, Thermo Scientific) as transfection reagent. Luciferase assays were performed in cells transiently co-transfected with equal amounts of plasmids expressing different forms of PPP3CA (or the empty parental vector pCMV2-FLAG as control), the firefly luciferase HIF reporter plasmids pGL3-5XHRE-VEGF or pGL3-

HRE1–8 [17] and control plasmid pCI-Renilla. When required, cells were treated with 1 μ M ionomycin (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) for 1 h or 1 mM dimethylloxalyl glycine (DMOG; Alexis Biochemicals) for 8 h. Luciferase activity was determined as previously described [16]. For transfections with siRNA, Lipofectamine 2000 was used (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) following the manufacturer's protocol. For hypoxic treatment, cells were exposed to 1% O₂, 94% N₂ and 5% CO₂ in an IN VIVO2 200 hypoxia workstation (Ruskin Life Sciences, Pencoed, UK).

2.5. SDS-PAGE, western blotting and antibodies

Proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analysed by western blotting. The following antibodies were used: *anti*-HIF-1 α polyclonal antibody (pAb) [18], *anti*-HIF-2 α polyclonal antibody (pAb) (1:750 dilution) from Novus Biologicals (Cambridge, UK), anti-Flag monoclonal antibody (mAb) (1:10000) from Sigma- Aldrich (St Louis, MO, USA), *anti*- β -actin mAb (1:5000 dilution) from Cell Signaling (Danvers, MA, USA), anti-PP2B-Aa (PPP3CA) mAb (1:500 dilution) from Santa Cruz (Dallas, T. X) and anti-histone 3 pAb (1:5000 dilution; ab1791) from Abcam (Cambridge, UK).

2.6. Immunofluorescence microscopy

Cells grown on coverslips were transfected with the siRNA for PPP3CA or with the plasmids expressing the different forms of the PPP3CA, incubated for 8 h under normoxic or hypoxic conditions and prepared for immunofluorescence microscopy as previously described [8] using as primary antibodies polyclonal *anti*-HIF-1 α [18] or monoclonal anti-FLAG and appropriate secondary antibodies. Cells were viewed by a Leica DFC480 camera (LAS software version V2.3.1. R1) on an Axioscope 40 Zeiss microscope. Scale bars were set to 10 μ m.

2.7. RNA extraction and real-time quantitative PCR

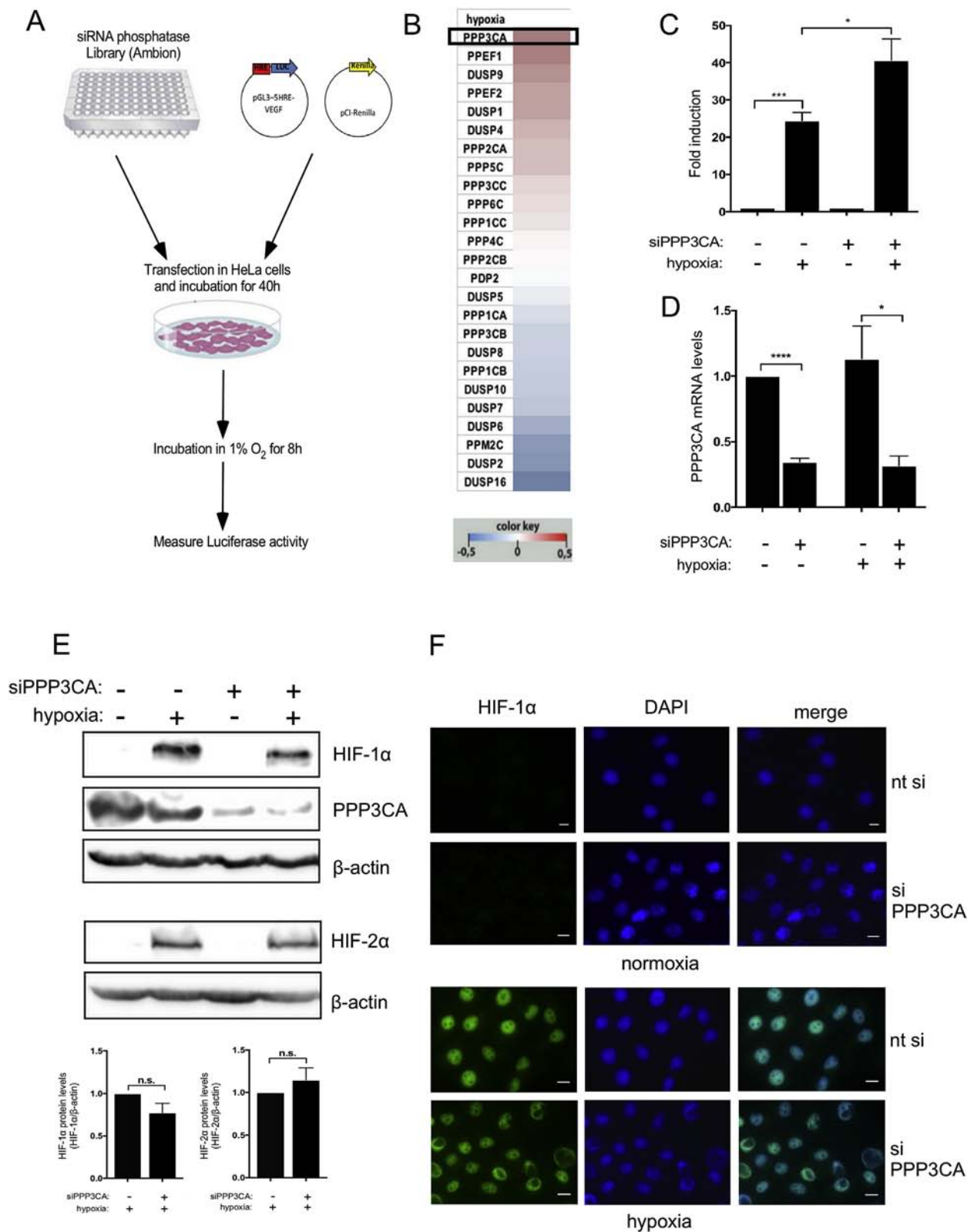
RNA extraction and cDNA synthesis was performed using NucleoZol (Macherey-Nagel, Duren, Germany) and the SensiFAST-TM cDNA synthesis kit (Bioline, Luckenwalde, Germany). Real-time quantitative PCR was performed with KAPA SYBR FAST qPCR (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) in a LightCycler 96 (Roche Life Science, Basel, Switzerland). The mRNAs encoding PPP3CA, LOX-1, PAI-1 and 18S rRNA were amplified using specific primers shown in Table S3. Each sample was assayed in duplicate for all targets. Relative quantitative gene expression was calculated using the $\Delta\Delta$ CT method and presented as a fold increase in relation to the respective controls.

2.8. Immunoprecipitation

Cells were lysed in buffer containing 25 mM Hepes, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF. After centrifugation, samples were incubated for 3 h at 4 °C, with 1 μ g of *anti*-HIF-1 α antibody. 20 μ l of Protein A-Sepharose bead slurry was added and incubation continued for 16 h at 4 °C under gentle shaking. Bound proteins were eluted in SDS sample buffer.

2.9. Statistical analysis

Statistical differences were assessed using the Graph Pad Prism version 6 software. Data are expressed as mean \pm s.e.m. Differences were examined by Student's t-test (two-tailed) between two groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).



(caption on next page)

3. Results

3.1. Silencing of PPP3CA expression stimulates HIF transcriptional activity without affecting HIF-α protein levels or HIF-1α localization

Since all characterized phosphorylation sites of HIF-1α and HIF-2α

involve Ser or Thr residues, we used siRNAs against the catalytic subunits of all known 25 serine-threonine and dual specificity phosphatases (Table S1) in order to silence their expression in HeLa cells carrying a reporter plasmid for HRE-dependent HIF transcriptional activity and incubated under hypoxia (Fig. 1A). Knockdown of several phosphatases including PPP3CA (CnA), PPEF1 and DUSP9 enhanced HIF

Fig. 1. Silencing of PPP3CA enhances HIF transcriptional activity under hypoxia. A) Schematic representation of the siRNA screen used in this work. HeLa cells were transfected with siRNAs for human phosphatases together with reporter plasmids and 40 h post-transfection were exposed to hypoxia (8 h) before determination of luciferase activity. B) Heat map representing total screening results as the \log_{10} ratio activities (average of three independent experiments performed in triplicates, each experiment using a different siRNA for every target), compared to the positive control (activity of cells transfected with control siRNA and incubated under hypoxia) which was set to 1 ($\log_{10} = 0$). PPP3CA (calcineurin A - CnA) is marked with a square. Ratio activities are represented according to the blue to red colour scale shown below the map. C) HIF activity, shown as fold increase in hypoxic samples compared to corresponding normoxic controls, in HeLa cells transfected with siRNA for PPP3CA (+) or control siRNA (–) and, 40 h post-transfection, incubated under 21% or 1% O_2 (8h). D) Determination of PPP3CA mRNA levels in cells treated as in (C) using real-time quantitative PCR. 18S rRNA was used for normalization. E) Immunoblotting analysis (images) of cells treated as in (C) using indicated antibodies and quantification (graphs) of HIF- α protein expression levels. F) Localization of endogenous HIF-1 α by indirect immunofluorescence microscopy in cells treated as in (C). DAPI was used for nuclei visualization. Scale bar = 10 μ M. Values in (C) and (D) are the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm S.E. (*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

transcriptional activity under hypoxia (Fig. 1B, marked in red & Table S2) while knockdown of others, such as DUSP16, DUSP2 and PPM2C (Fig. 1B, marked in blue & Table S2), caused reduction in HIF activity suggesting that several different phosphatases may be involved in HIF regulation. The potential role of PPP3CA, the catalytic subunit of Calcineurin A, was investigated further since its knockdown produced the most drastic positive effect on HIF activity. To confirm the involvement of PPP3CA, its expression was silenced using a different siRNA than the ones used in the screen. Again, significant stimulation of hypoxic HIF activity was observed after knockdown of PPP3CA (Fig. 1C), the efficiency of which was confirmed at both PPP3CA mRNA (Fig. 1D) and protein (Fig. 1E) levels. Despite the positive effect of PPP3CA silencing on hypoxic HIF activity, neither HIF-1 α nor HIF-2 α hypoxia-induced expression was increased upon PPP3CA silencing (Fig. 1E). Similarly, knockdown of PPP3CA did not affect the nuclear localization of HIF-1 α under hypoxia as shown by indirect immunofluorescence microscopy (Fig. 1F; *anti*-HIF-2 α antibodies could not be used for localization). These results suggest that PPP3CA negatively affects HIF activity, without however affecting the expression levels of its regulatory HIF- α subunits or the subcellular distribution of HIF-1 α .

3.2. Overexpression of catalytically active PPP3CA inhibits HIF activity without affecting HIF- α protein levels or HIF-1 α localization

To test whether the negative effect of PPP3CA on HIF activity entails its catalytic properties, a constitutively active FLAG-PPP3CA mutant form (Δ Cam_{wt}) or a catalytically inactive similar mutant (Δ Cam_{H151Q}) [15], were overexpressed in HeLa cells carrying the HIF reporter plasmid and incubated under hypoxia. As shown in Fig. 2A, overexpression of PPP3CA- Δ Cam_{wt} reduced HIF activity under hypoxia while the effect of the PPP3CA- Δ Cam_{H151Q} (expressed at similar levels; Fig. 2B) was weaker and not significant (Fig. 2A), suggesting that PPP3CA enzymatic activity is required for downregulating HIF. Neither HIF-1 α nor HIF-2 α protein levels were significantly affected by the overexpression of the PPP3CA mutants (Fig. 2B) indicating that PPP3CA exerts its effect on HIF activity rather than on the expression of the HIF- α subunits. Furthermore, the overexpressed PPP3CA mutant forms were localised mainly in the cytoplasm in contrast to HIF-1 α that maintained its nuclear localization (Fig. 2C).

3.3. Activation of PPP3CA by ionomycin inhibits HIF activity and hypoxia-dependent gene expression

To corroborate our data with pharmacological means, cells were treated with the calcium ionophore ionomycin, which activates the catalytic activity of PPP3CA [19]. Addition of ionomycin, 1 h prior to subsequent hypoxic incubation of HeLa cells, decreased the HRE-dependent activity of HIF (Fig. 3A, left panel), without however, affecting the protein expression levels of either HIF-1 α or HIF-2 α (Fig. 3B, left panel). The same results were also obtained upon non-hypoxic HIF activation by DMOG, an agent that inhibits HIF prolyl-hydroxylases and stabilizes HIF- α subunits even under normoxic conditions (Fig. 3A & B, right panels) indicating again that PPP3CA affects a step downstream of

HIF- α stabilization. In agreement, treatment with ionomycin under normoxic conditions did not stabilize either HIF-1 α or HIF-2 α (Fig. 3B).

More importantly, ionomycin reduced the expression of known hypoxia-target genes such as LOX-1 (specific for HIF-1) and PAI-1 (specific for HIF-2), that were induced under hypoxia (Fig. 3C). Therefore, ionomycin reduced both HIF transcriptional activity and HIF-dependent gene expression under hypoxia, presumably by activating PPP3CA. To verify the latter, ionomycin was added to HeLa cells in which expression of PPP3CA had been silenced via siRNA. While ionomycin reduced significantly HIF activity in control cells, its effect on cells with silenced PPP3CA was much weaker (Fig. 4A) showing that ionomycin inhibits HIF, at least partly, by activating PPP3CA.

To positively verify the PPP3CA role in the ionomycin effect, ionomycin was added to cells overexpressing wild-type FLAG-PPP3CA under hypoxia. Overexpression of wild-type PPP3CA inhibited HIF activity, showing that PPP3CA is, at least partially, active under our experimental conditions (Fig. 4B). Ionomycin enhanced this inhibition as expected by its stimulatory effect on PPP3CA (Fig. 4B). Neither overexpression of wild-type PPP3CA alone nor its combination with ionomycin altered the protein expression (Fig. 4C) or localization of HIF-1 α (Fig. 4D). As with the constitutively active mutant (Δ Cam_{wt}; Fig. 2C), wild-type FLAG-PPP3CA was also localised predominantly in the cytoplasm (Fig. 4D).

To confirm our data, a different reporter construct, containing the full-length native human *LPIN1* promoter known to be targeted by HIF-1 [17], was used to measure HIF-1 activity in cells treated with ionomycin or overexpressing wild-type FLAG-PPP3CA or both. Both ionomycin treatment or PPP3CA overexpression inhibited hypoxic activation of the HIF-1-dependent promoter and, more importantly, a further reduction in HIF-1 activity was observed when the two conditions were combined (Fig. 4E), suggesting a causative relationship between ionomycin, activation of PPP3CA and inhibition of HIF-1 activity.

In order to test if PPP3CA directly acts on HIF-1 α , the physical association of the endogenous proteins was analysed by immunoprecipitation. Although the association of HIF-1 α with ARNT was readily detected, endogenous PPP3CA was absent from HIF-1 α immunoprecipitates even when PPP3CA was activated by ionomycin (Fig. 4F). Moreover, overexpressed forms of PPP3CA (constitutively active PPP3CA- Δ Cam_{wt} and catalytically inactive PPP3CA- Δ Cam_{H151Q}) also failed to interact with overexpressed GFP-HIF-1 α (Fig. 4G), even though ARNT association with HIF-1 α was not affected, suggesting once more that, first, inhibition of HIF-1 activity by ionomycin or overexpression of PPP3CA does not involve the HIF-1 α /ARNT interaction, and second, HIF-1 α does not associate physically with PPP3CA, favoring an indirect effect.

4. Discussion

Our siRNA screen to identify catalytic subunits of phosphatases involved in the regulation of HIF activity provided PPP3CA as a candidate inhibitor of HRE-dependent transcriptional activity. Independent knock-down and overexpression experiments, verified this role of PPP3CA and showed the requirement of its catalytic activity for HIF

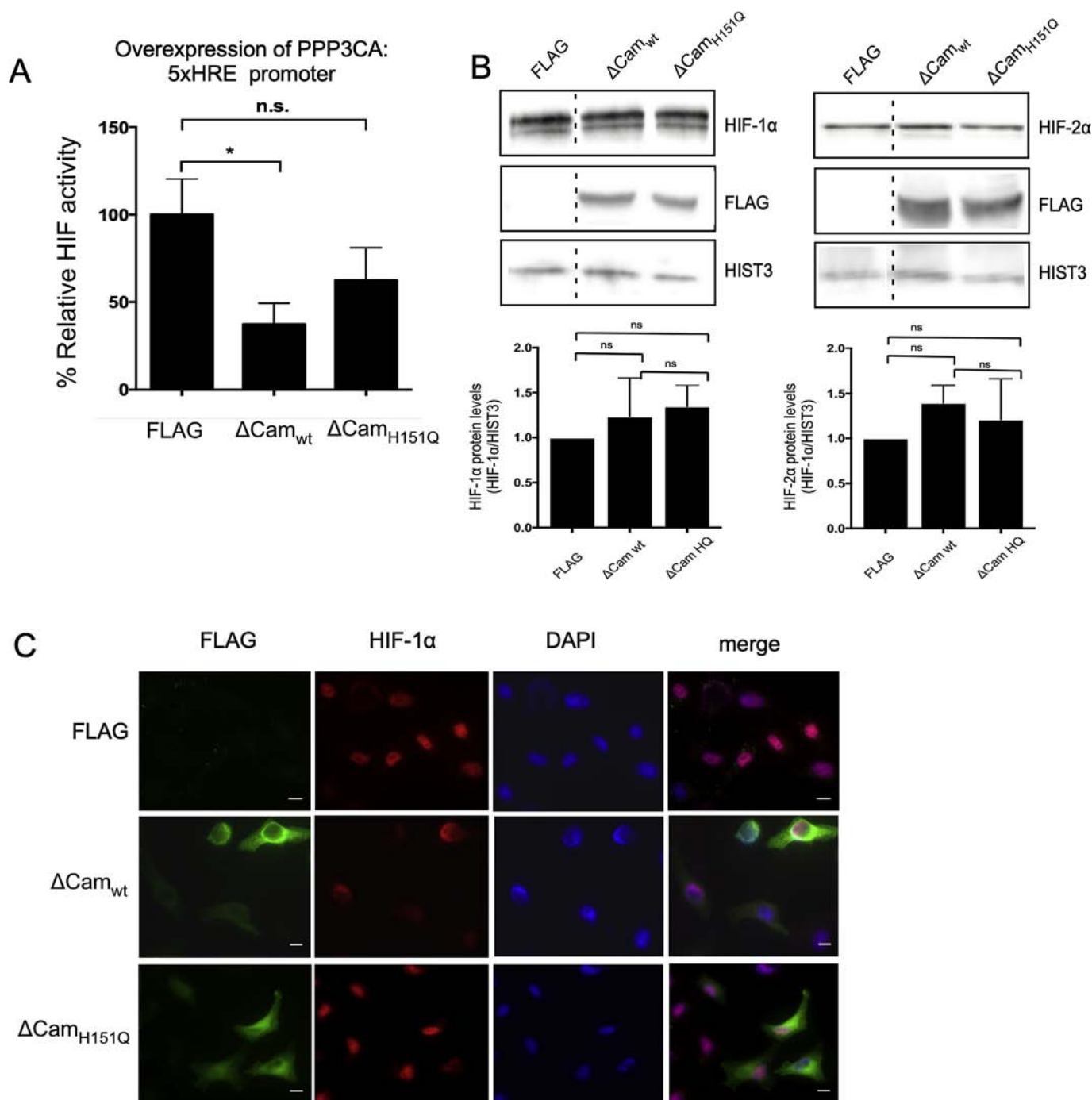


Fig. 2. Overexpression of catalytically active PPP3CA inhibits HIF transcriptional activity. **A**) Relative HIF activity in HeLa cells transfected with an empty FLAG vector or the indicated Flag-tagged PPP3CA constructs and incubated under 21% or 1% O_2 (8 h). Values are the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm S.E. (**: $P < 0.01$; n. s.: not significant). **B**) Immunoblotting analysis (images) of cells treated as in **A**) and incubated under hypoxia using indicated antibodies and quantification (graphs) of HIF- α protein expression levels. Histone 3 (HIST3) was used as loading control. **C**) Indirect immunofluorescence microscopy analysis of cells treated as in **A**) using indicated antibodies. DAPI was used for nuclei visualization. Scale bar = 10 μM .

inhibition. This was confirmed by exploiting ionomycin, an agent that stimulates the enzymatic activity of PPP3CA. PPP3CA is the catalytic subunit of calcineurin, normally composed of PPP3CA (CnA) and the regulatory subunit calcineurin B (CnB). There are two additional catalytic subunit isoforms (PPP3CB, and PPP3CC), which, according to our siRNA screen results, are most likely not involved in HIF regulation.

Previous studies have implicated calcineurin in the cellular response to hypoxia [20,21]. CnA overexpression in transgenic mice caused upregulation of HIF-1 α levels in an HSP90-dependent manner [21] and CnA overexpression in HEK293T cells or ionomycin treatment

increased HIF-1 α protein expression and activity [20]. The latter was mediated by calcineurin-dependent dephosphorylation of RACK1, a protein responsible for oxygen-independent HIF-1 α degradation [20]. Unlike these previous data, we were not able to detect any significant changes in the protein expression levels of either HIF-1 α or HIF-2 α under all conditions tested (PPP3CA silencing or overexpression and ionomycin treatment) that could affect calcineurin activity in HeLa cells. Furthermore, in all our experiments, activation of calcineurin was inversely correlated to HIF transcriptional activity or HIF-dependent gene expression. This controversy may be explained by cell/tissue

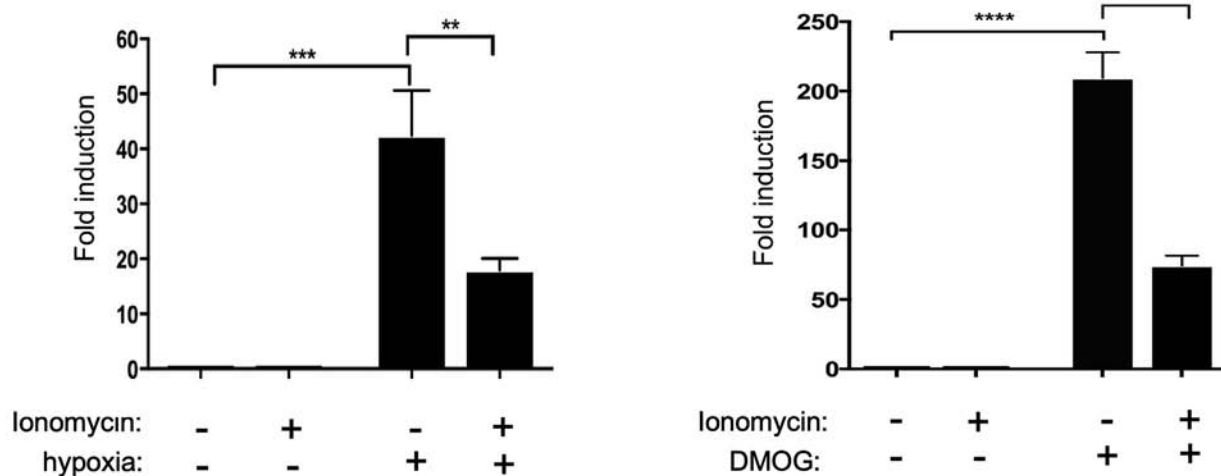
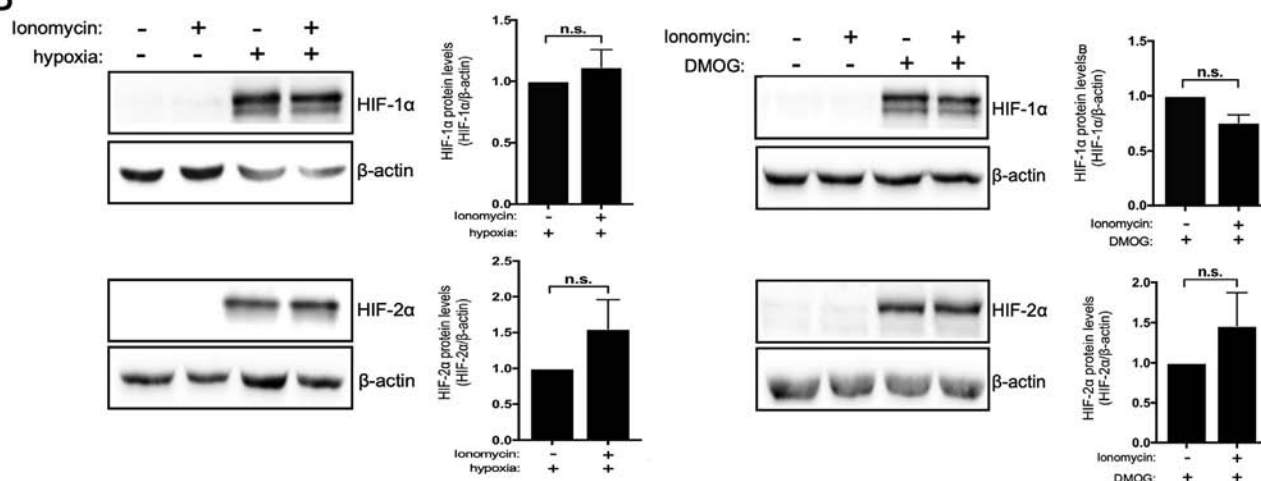
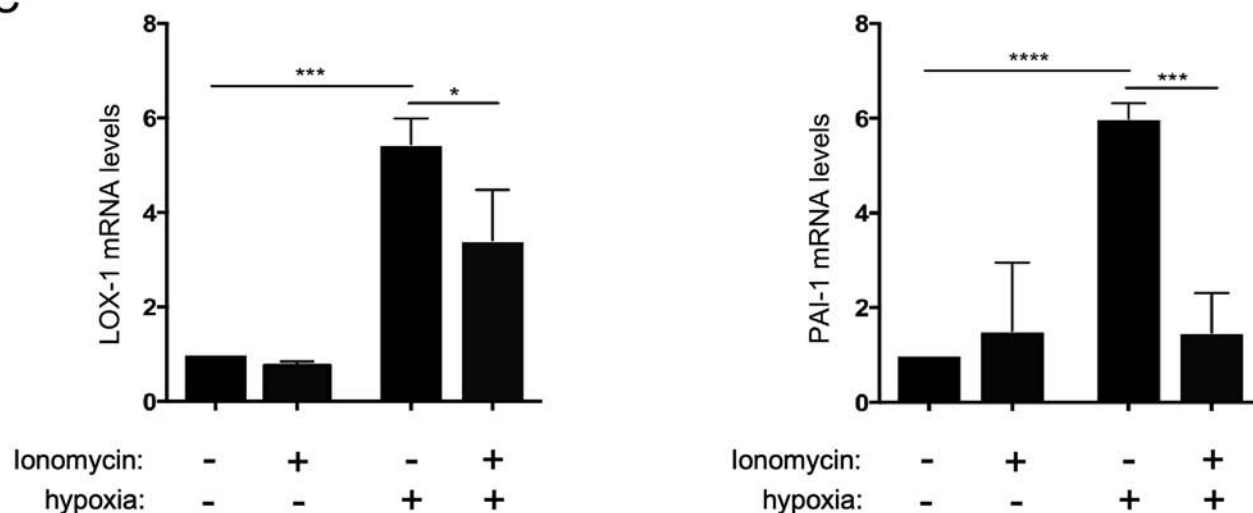
A**B****C**

Fig. 3. Ionomycin inhibits HIF activity and hypoxia-dependent gene expression. A) HIF activity, shown as fold increase compared to normoxic controls, in HeLa cells treated \pm ionomycin (1 μ M; 1 h) and exposed to 21% or 1% O₂ (8 h; left) or further treated \pm 1 mM DMOG (8h; right). B) Immunoblotting analysis (images) of cells treated as in (A) using indicated antibodies and quantification (graphs) of HIF- α protein expression levels. C) Determination of mRNA expression levels of two hypoxia target genes in cells treated as in (A). Values in (A) and (C) are the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm S.E. (*: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001, ****: P < 0.0001).

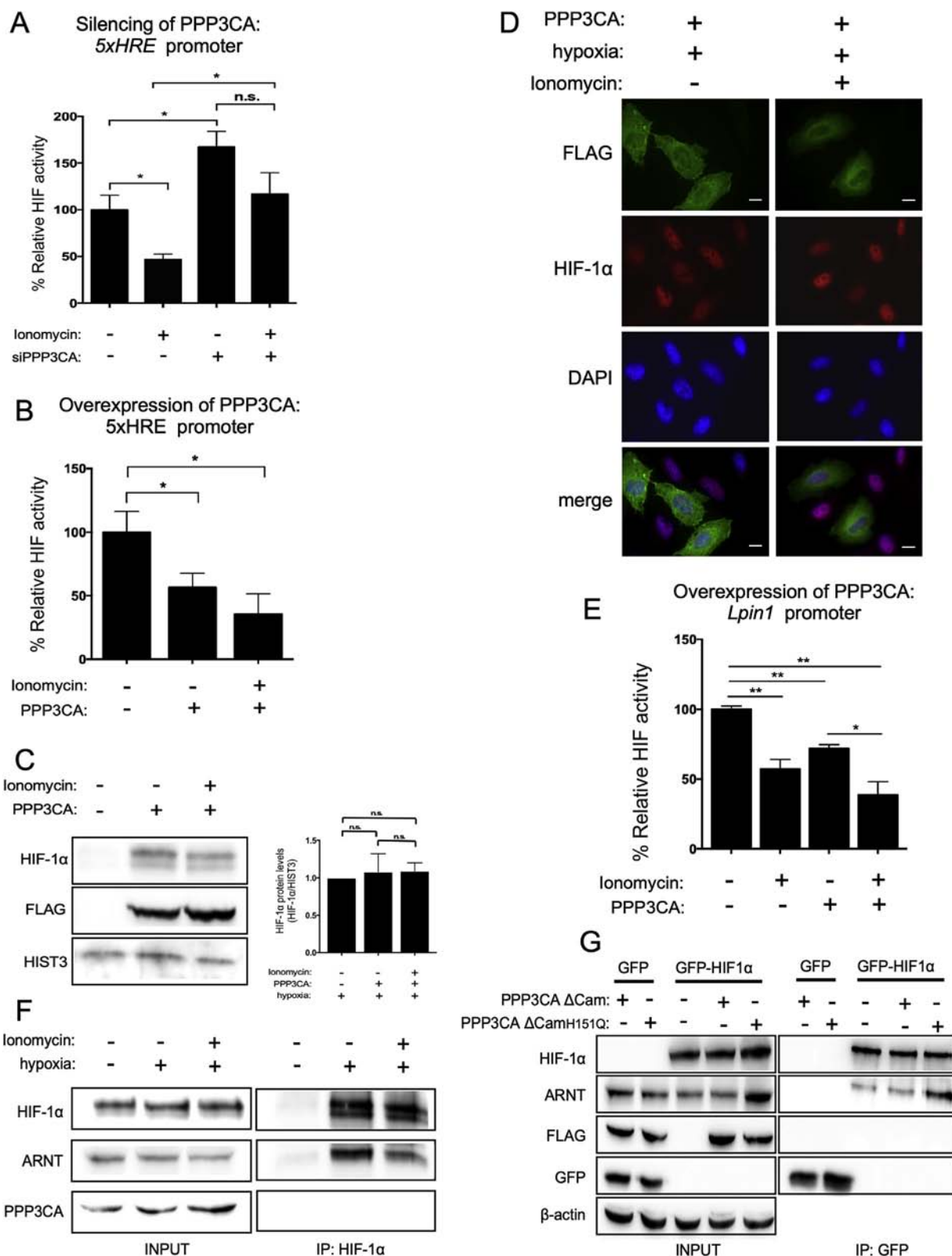


Fig. 4. PPP3CA mediates inhibition of HIF activity by ionomycin. **A)** Relative HIF activity in HeLa cells transfected with PPP3CA (+) or control (–) siRNA and, 40 h post-transfection, treated \pm 1 μ M ionomycin (1 h) and exposed to 21% or 1% O₂ (8 h). **B)** Relative HIF activity in HeLa cells transfected with empty FLAG or FLAG-PPP3CA vector and treated as in (A). **C)** Immunoblotting analysis (images) of cells treated as in (B) using indicated antibodies and quantification (graph) of HIF-1 α protein expression levels. **D)** Indirect immunofluorescence microscopy analysis of cells treated as in (B) using indicated antibodies. DAPI was used for nuclei visualization. Scale bar = 10 μ m. **E)** HIF activity (using reporter plasmid pGL3-HRE1–8 with the human *LPIN1* promoter) in HeLa cells transfected with empty FLAG or FLAG-PPP3CA vector and treated as in (A). **F)** Immunoblotting analysis of soluble extracts (input) or HIF-1 α immunoprecipitates (IP) of HeLa cells treated as in (A) using the indicated antibodies. **G)** Immunoblotting analysis of soluble extracts (input) or GFP immunoprecipitates (IP) of HeLa cells transfected with empty GFP or GFP-HIF-1 α vector together with the indicated Flag-tagged PPP3CA constructs, using the indicated antibodies. Values in (A), (B) and (E) are the mean of three independent experiments performed in triplicate \pm S.E. (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; N.S.: Not Significant).

specificity of the RACK1-mediated HIF-1 α degradation system or by cell/tissue specific expression of the calcineurin regulatory subunits and suggests that calcineurin may have diverse effects on HIF activity that depend on the cellular and/or tissue context.

Despite their consistency, our data were not sufficient to provide a definite molecular mechanism for the effect of calcineurin on HIF activity. Given the fact that under all conditions, the expression of the O₂-regulated HIF- α subunits was not apparently affected, calcineurin must exert its effect at a step downstream of hypoxia-dependent HIF- α stabilization. Once stabilized, HIF- α subunits have to enter the nucleus in order to form functional DNA binding dimers with nuclear ARNT. Additionally, both HIF- α isoforms have been previously shown to behave as shuttling proteins and their nucleocytoplasmic distribution was shown to be controlled through their direct phosphorylation by either ERK1/2, in the case of HIF-1 α [16], or CK1 δ , in the case of HIF-2 α [10]. In both cases, phosphorylation increases their nuclear concentration and, subsequently, their activity. So, a likely scenario to explain the inhibitory effect of calcineurin would be calcineurin-dependent dephosphorylation of the corresponding phospho-sites. At least in the case of HIF-1 α , that we were able to test, this scenario became unlikely as its nuclear accumulation was not perturbed by the conditions that activated calcineurin.

Another possibility entails direct or indirect involvement of calcineurin in the nuclear steps of HIF-dependent transcriptional activation, such as binding of HIFs to chromatin and recruitment of transcriptional cofactors. This scenario requires the presence of calcineurin inside the nucleus. As our own results indicate, PPP3CA is mainly found in the cytoplasm but previously published data support its presence also inside the nucleus [22,23]. Binding of HIF-1 to DNA can be inhibited by CK1 δ -mediated phosphorylation of HIF-1 α which impairs formation of the HIF-1 α /ARNT heterodimer [9,24]. However, reversal of this phosphorylation could not be a target of calcineurin as it would lead to further activation of HIF-1 and not inhibition. Furthermore, our immunoprecipitation data suggest that the interaction between HIF-1 α and ARNT is not perturbed in the presence of ionomycin. On the other hand, phosphorylation of a conserved threonine residue in the C-terminal transactivation domain of both HIF- α isoforms (Thr796 in HIF-1 α and Thr844 in HIF-2 α) is known to stimulate their transcriptional activity by inhibiting their association with Factor Inhibiting HIF (FIH) and/or enhancing their binding to transcriptional coactivator CBP/p300 [12,25]. De-phosphorylation of this site by calcineurin leading to inhibition of HIF activity is a possible scenario. However, the fact that we were not able to detect any physical association between HIF-1 α and PPP3CA in our immunoprecipitation experiments makes more likely the possibility that calcineurin acts indirectly on HIF activity by targeting phospho-sites on HIF- α molecular partners or coactivators [5]. This is also supported by the fact that HIF-1 α does not contain any of the known PPP3CA binding motifs (PxIxIT and LxVP) that were previously identified in a number of established PPP3CA direct substrates [26].

In conclusion, we have identified the calcineurin catalytic subunit PPP3CA as an enzymatic regulator of HIF activity and hypoxia-induced gene expression. Further investigation of this mechanism and identification of the relevant calcineurin substrates will provide not only important details on the crosstalk between signaling pathways and the cellular response to hypoxia but also new therapeutic targets for hypoxia-related diseases and cancer.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This work was partially supported by program “HYPOXYTARGET” (3129 to G.S.), implemented under the “ARISTEIA II” Action of the

“OPERATIONAL PROGRAM EDUCATION AND LIFELONG LEARNING” and co-funded by the European Social Fund and National Resources. A.K. was also supported by a fellowship from the States Scholarship Foundation (IKY).

Acknowledgments

We thank Prof. Dr. R. Marienfeld (University of Ulm, Germany) for kindly providing PPP3CA expression plasmids.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.007>.

References

- [1] G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine, *Cell* 148 (3) (2012) 399–408.
- [2] C.J. Hu, L.Y. Wang, L.A. Chodosh, B. Keith, M.C. Simon, Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation, *Mol. Cell Biol.* 23 (24) (2003) 9361–9374.
- [3] C.J. Schofield, P.J. Ratcliffe, Signalling hypoxia by HIF hydroxylases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (1) (2005) 617–626.
- [4] E.Y. Dimova, C. Michiels, T. Kietzmann, Kinases as upstream regulators of the HIF system: their emerging potential as anti-cancer drug targets, *Curr. Pharmaceut. Des.* 15 (33) (2009) 3867–3877.
- [5] T. Kietzmann, D. Mennerich, E.Y. Dimova, Hypoxia-inducible factors (HIFs) and phosphorylation: impact on stability, localization, and transactivity, *Front Cell Dev Biol* 4 (2016) 11.
- [6] V.L. Dengler, M. Galbraith, J.M. Espinosa, Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49 (1) (2014) 1–15.
- [7] G.L. Semenza, A compendium of proteins that interact with HIF-1 α , *Exp. Cell Res.* 356 (2) (2017) 128–135.
- [8] I. Mylonis, G. Chachami, E. Paraskeva, G. Simos, Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK, *J. Biol. Chem.* 283 (41) (2008) 27620–27627.
- [9] A. Kalousi, I. Mylonis, A.S. Politou, G. Chachami, E. Paraskeva, G. Simos, Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1, *J. Cell Sci.* 123 (Pt 17) (2010) 2976–2986.
- [10] E. Pangou, C. Befani, I. Mylonis, M. Samiotaki, G. Panayotou, G. Simos, P. Liakos, HIF-2 α phosphorylation by CK1 δ promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia, *J. Cell Sci.* 129 (22) (2016) 4213–4226.
- [11] K.K. To, O.A. Sedelnikova, M. Samons, W.M. Bonner, L.E. Huang, The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1 α from HIF-2 α in NBS1 repression, *EMBO J.* 25 (20) (2006) 4784–4794.
- [12] K. Gradin, C. Takasaki, Y. Fujii-Kuriyama, K. Sogawa, The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine, *J. Biol. Chem.* 277 (26) (2002) 23508–23514.
- [13] T. Hunter, Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell* 80 (2) (1995) 225–236.
- [14] I.M. Mansuy, S. Shenolikar, Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory, *Trends Neurosci.* 29 (12) (2006) 679–686.
- [15] L. Palkowitsch, U. Marienfeld, C. Brunner, A. Eitelhuber, D. Krappmann, R.B. Marienfeld, The Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin controls the formation of the Carma1-Bcl10-Malt1 complex during T cell receptor-induced NF- κ B activation, *J. Biol. Chem.* 286 (9) (2011) 7522–7534.
- [16] I. Mylonis, G. Chachami, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Paraskeva, A. Kalousi, E. Georgatsou, S. Bonanou, G. Simos, Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α , *J. Biol. Chem.* 281 (44) (2006) 33095–33106.
- [17] I. Mylonis, H. Sembongi, C. Befani, P. Liakos, S. Siniosoglou, G. Simos, Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression, *J. Cell Sci.* 125 (Pt 14) (2012) 3485–3493.
- [18] A. Lyberopoulou, E. Venieris, I. Mylonis, G. Chachami, I. Pappas, G. Simos, S. Bonanou, E. Georgatsou, MgcRacGAP interacts with HIF-1 α and regulates its transcriptional activity, *Cell. Physiol. Biochem.* 20 (6) (2007) 995–1006.
- [19] C.B. Klee, H. Ren, X. Wang, Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin, *J. Biol. Chem.* 273 (22) (1998) 13367–13370.
- [20] Y.V. Liu, M.E. Hubbi, F. Pan, K.R. McDonald, M. Mansharamani, R.N. Cole, J.O. Liu, G.L. Semenza, Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1 α expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization, *J. Biol. Chem.* 282 (51) (2007) 37064–37073.
- [21] S. Eschricht, K.U. Jarr, C. Kuhn, L. Lehmann, M. Kreusser, H.A. Katus, N. Frey, E. Chorianopoulos, Heat-shock-protein 90 protects from downregulation of HIF-1 α in calcineurin-induced myocardial hypertrophy, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 85 (2015) 117–126.
- [22] R. Bosser, R. Aligue, D. Guerini, N. Agell, E. Carafoli, O. Bachs, Calmodulin can modulate protein phosphorylation in rat liver cells nuclei, *J. Biol. Chem.* 268 (21)

- (1993) 15477–15483.
- [23] F. Shibasaki, E.R. Price, D. Milan, F. McKeon, Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4, *Nature* 382 (6589) (1996) 370–373.
- [24] M. Kourti, G. Ikonou, N.N. Giakoumakis, M.A. Rapsomaniki, U. Landegren, S. Siniosoglou, Z. Lygerou, G. Simos, I. Mylonis, CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation, *Cell. Signal.* 27 (6) (2015) 1129–1140.
- [25] D.E. Lancaster, L.A. McNeill, M.A. McDonough, R.T. Aplin, K.S. Hewitson, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, C.J. Schofield, Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity, *Biochem. J.* 383 (Pt. 3) (2004) 429–437.
- [26] H. Li, A. Rao, P.G. Hogan, Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins, *Trends Cell Biol.* 21 (2) (2011) 91–103.